

Aus dem Anatomischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. R. Lucius)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Untersuchungen zum Einfluss von Harnsäure auf Mikroglia

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Lars Scheffel
aus Geesthacht

Kiel, 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralph Lucius, Anatomisches Institut
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly, Biochemisches Institut
Tag der mündlichen Prüfung: 28.09.2020
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 15.07.2020

gez.: Prof. Dr. Johann Roider
Vorsitzender des Ausschusses für Promotion

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis	
II	Abbildungsverzeichnis	
III	Tabellenverzeichnis	
1	Einleitung	1
1.1	Gesundheitsökonomische Belastung durch neurodegenerative Erkrankungen	1
1.2	Morbus Parkinson	2
1.2.1	Pathogenese	3
1.3	PD und das Immunsystem	4
1.3.1	Mikroglia und Neuroinflammation	5
1.4	Harnsäure und PD	8
1.4.1	HS im Organismus	9
1.4.2	HS: Zweiseitiges Schwert des Immunsystems	10
1.4.3	HS als Disease-modifying Drug?	11
1.5	Zielsetzung	12
2	Material	13
2.1	Geräte	13
2.2	Verbrauchsmaterialien	14
2.3	Chemikalien und Reagenzien	14
2.4	Lösungen und Puffer	16
2.5	Kits	18
2.6	Enzyme	19
2.7	Primer	19
2.8	TaqMan®-Assay on Demand (Life Technologies)	19
2.9	Antikörper	19
2.9.1	Primärantikörper	19
2.9.2	Sekundärantikörper	20

2.10	Primäre Mikroglia	20
2.11	Computersoftware	20
3	Methoden	21
3.1	Isolierung und Kultivierung primärer Mikroglia	21
3.1.1	Präparation der Versuchstiere	21
3.1.2	Ernte primärer Mikroglia	22
3.1.3	Aussaat der Mikroglia	22
3.2	Stimulation der Mikroglia	23
3.3	Zellbiologische Untersuchungen	23
3.3.1	Zytotoxizitätstest	23
3.3.2	Proliferationstest	24
3.3.3	Indirekte Stickstoffmonoxid-Messung	25
3.4	Molekularbiologische Untersuchungen	25
3.4.1	Isolierung der Gesamt-RNA für die qPCR	25
3.4.2	Synthese der komplementären DNA (cDNA)	26
3.4.3	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	27
3.4.4	Western-Blot-Analyse	28
3.5	Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)	31
3.6	Statistische Auswertung	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Einfluss von Harnsäure auf das Überleben von Mikroglia	33
4.2	Einfluss von Harnsäure auf das Proliferationsverhalten von Mikroglia	34
4.3	Einfluss von Harnsäure auf den Aktivierungszustand von Mikroglia	35
4.3.1	Einfluss von Harnsäure auf die iNOS mRNA-Expression in Mikroglia	35
4.3.2	Einfluss von Harnsäure auf die NO-Freisetzung von Mikroglia	36
4.4	Einfluss von Harnsäure auf proinflammatorische Zytokine in Mikroglia	37
4.4.1	Einfluss auf TNF- α -Freisetzung aus Mikroglia	37

4.4.2	Einfluss von Harnsäure auf die IL-6-Freisetzung in Mikroglia.....	39
4.4.3	Einfluss von Harnsäure auf die IL-1 β mRNA-Expression	41
4.5	Einfluss von Harnsäure auf proinflammatorische Enzyme in Mikroglia.....	42
4.5.1	Einfluss von Harnsäure auf die COX-2 mRNA-Expression.....	42
4.5.2	Einfluss auf die MMP-9 mRNA-Expression	43
4.5.3	Zusammenfassende Darstellung der mRNA-Untersuchungen	44
4.6	Einfluss von Harnsäure auf intrazelluläre Signalwege in Mikroglia	45
4.6.1	Einfluss von Harnsäure auf den MAP-Kinasen-Signalweg	45
5	Diskussion	47
5.1	Toxizität der Harnsäure	47
5.2	Einfluss von Harnsäure auf die Proliferation von Mikroglia	48
5.3	Einfluss von Harnsäure auf die Stickstoffmonoxidproduktion von Mikroglia ...	48
5.4	Einfluss von Harnsäure auf proinflammatorische Faktoren in Mikroglia	49
5.5	Wirkungsmechanismus der Harnsäure auf Mikroglia.....	50
5.6	Klinische Relevanz von Harnsäure: Potenzial in der Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen?	51
6	Zusammenfassung.....	53
7	Literatur.....	55
8	Erklärung.....	63
9	Danksagung.....	64

I Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AD	Morbus Alzheimer (von engl. <i>Alzheimer's disease</i>)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
COX-2	Cyclooxygenase-2
CSF	<i>Liquor cerebrospinalis</i>
DRG	Diagnosebezogene Fallgruppen (von engl. <i>Diagnosis related groups</i>)
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK1/2	<i>extracellular regulated MAP kinase 1/2</i>
HS	Harnsäure
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
MMP-9	Matrix-Metalloprotease-9
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MSU	Mononatriumurat
NF κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NO	Stickstoffmonoxid
P2X7-Rezeptor	P2X Purinrezeptor 7
PD	Morbus Parkinson (von engl. <i>Parkinson's disease</i>)
pERK1/2	phosphoryliertes ERK1/2
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
SN	<i>Substantia nigra</i>
SNpc	<i>Substantia nigra Pars compacta</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
ZNS	zentrales Nervensystem

II Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Illustration der Parkinson-Krankheit von Sir William Richard Gowers aus: A Manual of Diseases of the Nervous System (Handbuch für Krankheiten des Nervensystems) von 1886
- Abb. 2:** Darstellung des stadienhaften Verlaufs der PD in Anlehnung an Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. Cell Tissue Res 2004, 318: 122
- Abb. 3:** Chemische Struktur von Harnsäure
- Abb. 4:** Harnsäure ist nicht zytotoxisch für Mikroglia
- Abb. 5:** Harnsäure hemmt die Proliferation von LPS-aktivierten Mikroglia
- Abb. 6:** Harnsäure reduziert die mRNA Expression von iNOS in LPS aktivierten Mikroglia nach 6 h und 24 h
- Abb. 7:** Harnsäure senkt die NO-Freisetzung aus LPS-aktivierten Mikroglia
- Abb. 8:** Harnsäure senkt die mRNA-Expression von TNF- α in LPS-aktivierten Mikroglia
- Abb. 9:** Harnsäure reduziert die TNF- α Freisetzung aus LPS-aktivierten Mikroglia nach 6 h und 24 h
- Abb. 10:** Harnsäure reduziert die IL-6 mRNA-Expression in LPS-aktivierten Mikroglia nach 6 h und 24 h
- Abb. 11:** Harnsäure senkt die IL-6-Freisetzung aus LPS-aktivierten Mikroglia nach 6 h und 24 h
- Abb. 12:** Harnsäure reduziert die IL-1 β mRNA-Expression in LPS-aktivierten Mikroglia nach 6 h und 24 h
- Abb. 13:** Harnsäure reduziert die COX-2 mRNA-Expression in LPS-aktivierten Mikroglia nach 6 h und 24 h
- Abb. 14:** Harnsäure reduziert die MMP-9 mRNA-Expression in LPS-aktivierten Mikroglia nach 6 h und 24 h
- Abb. 15:** Harnsäure senkt die Phosphorylierung von ERK1/2 in LPS-aktivierten Mikroglia nach 45 min
- Abb. 16:** Harnsäure senkt die Phosphorylierung von ERK1/2 in LPS-aktivierten Mikroglia nach 45 min

III Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammenfassung der qPCR-Ergebnisse die proinflammatorischen Zytokine

Tab. 2: Zusammenfassung der qPCR-Ergebnisse die proinflammatorischen Enzyme

1 Einleitung

1.1 Gesundheitsökonomische Belastung durch neurodegenerative Erkrankungen

Durch politische Veränderungen und die Umsetzung des diagnosebezogenen Fallgruppen Klassifikationssystems (DRG) rücken gesundheitsökonomische Aspekte immer häufiger in den Mittelpunkt. Zusätzlich zwingt die demographische Veränderung der Bevölkerungsstruktur zum optimierten Umgang mit den Ressourcen.

In den letzten hundert Jahren ist die Lebenserwartung der Menschen in Industrienationen stetig angestiegen, gleichzeitig sind die Geburtenzahlen zurückgegangen. Dieser demographische Wandel führt zu einer Überalterung der Gesellschaft, verbunden mit gesundheitsökonomischen Problemen. Schon jetzt sind 20,8% der Deutschen über 65 Jahre alt [1]. Mit der steigenden Anzahl von älteren Menschen treten Erkrankungen, deren vorrangiger Risikofaktor das Alter ist, vermehrt auf. Hierzu zählen neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer (AD) und Morbus Parkinson (PD). Beim PD liegt die Prävalenz bei 0,3% der Gesamtbevölkerung und werden nur die über 60-jährigen Personen betrachtet, steigt die Prävalenz auf 1% [2]. Hiernach würden in Deutschland derzeit rund 220.000 Menschen am PD leiden. Die Betroffenen erleiden eine Einschränkung ihrer Mobilität bis hin zur Immobilisierung sowie mit der Erkrankung assoziierten Erkrankungen, die häufig nicht erkannt und nicht adäquat therapiert werden [3]. Neben dem persönlichen Leidensweg der Patienten belastet die Erkrankung die Gesellschaft. Durchschnittlich entstehen bei der Behandlung pro PD-Patient jährliche Kosten in Höhe von 17.220 € [4]. Die Kosten sind hierbei abhängig von dem Krankheitsstadium [3]. Dies bedeutet eine jährliche Belastung des Gesundheitssystems in Höhe von 3.788.400.000 €. Jedoch bleiben hierbei viele Faktoren unberücksichtigt. An PD erkrankte Personen scheiden im Schnitt 10 Jahre vor dem Renteneintrittsalter aus dem Berufsleben aus und belasten das Rentensystem [5]. Zudem werden in Deutschland rund 90% der Betroffenen durch Angehörige gepflegt, deren Arbeitskraft dem Arbeitsmarkt dann nicht zur Verfügung steht [4]. So lassen sich die wirklichen Kosten nur schwer abschätzen. Verschlimmernd kommt hinzu, dass sich die Anzahl der PD-Erkrankten bis 2030 mehr als verdoppeln wird [6].

Trotz jahrelanger intensiver Forschung sind noch keine kurativen Therapien in Sicht. In Zusammenschau der steigenden Fallzahlen, des starken Leidensdruckes der Betroffenen sowie der stark steigenden Kosten für das Gesundheitssystem ist die Erforschung einer effektiven Parkinsontherapie ein hochrangiges Ziel.

1.2 Morbus Parkinson

Der PD ist eine altersbedingte und komplexe neurodegenerative Erkrankung. Er zeichnet sich durch den frühen und selektiven Verlust von dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) im Hirnstamm und die intraneuronale Ansammlung von größtenteils aus präsynaptischen α -Synuclein bestehenden Proteinaggregaten, den sog. Lewy-Körperchen, aus [7–9]. Der Verlust der dopaminergen Neuronen in der SNpc bewirkt ein Dopamindefizit im *Corpus striatum*. Das *Corpus striatum* ist ein Bestandteil der Basalganglien im Großhirn. Die Basalganglien stellen einen subkortikal vernetzten Regelkreis dar, dessen Funktion unter anderem die Ausgestaltung



Abb. 1: Illustration der Parkinson-Krankheit von Sir William Richard Gowers aus: A Manual of Diseases of the Nervous System (Handbuch für Krankheiten des Nervensystems) von 1886

von Bewegungsabläufen ist. Die reduzierte Dopaminkonzentration kann lange kompensiert werden, jedoch im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung, das heißt ab einem Verlust von ca. 70% der dopaminergen Neuronen in der SNpc, zeigt sich eine Dysregulation der motorischen Schleife der Basalganglien und schließlich die klinische Manifestation eines PD [10–12].

Zur klinischen Diagnose eines PD muss neben einer Akinese mindestens eines der folgenden Symptome zusätzlich vorliegen: Rigor, ein 4- bis 6- Hz Ruhetremor oder eine posturale Instabilität [13]. Im Verlauf der Erkrankung können weitere, den Krankheitsverlauf verkomplizierende Symptome hinzukommen [14]. Hierzu zählen kognitive Symptome wie geistiger Verfall, Demenz, Halluzinationen und Depressionen, aber auch das autonome Nervensystem betreffende Symptome, wie symptomatische posturale Hypotension und Urininkontinenz [15]. Bereits Jahre vor dem

Erkrankungsausbruch kann bei Betroffenen eine Hyposmie und Depression auftreten und auf einen PD hindeuten [14].

Gegenwärtige Therapien zielen auf die Reduktion der motorischen Symptome ab. Hierfür stehen sowohl unterschiedliche medikamentöse als auch neurochirurgische Verfahren zur Verfügung, wodurch die Progredienz der Symptome verlangsamt wird, jedoch nicht kurativ in den Krankheitsverlauf eingegriffen werden kann [16, 12].

Der PD ist neben dem AD die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung [2]. In Europa liegt die Jahresinzidenz für eine PD zwischen 5 aus 1.000.000 bis 26 aus 100.000 Einwohner [17]. Vor dem 60. Lebensjahr ist der PD selten (6,2 – 9,5% der Fälle) [18]. Die Gesamtmortalität hängt stark von der Dauer der Erkrankung ab, die Hazard Ratio beträgt 1,8 [19].

1.2.1 Pathogenese

Der Entstehungsmechanismus des PD ist noch nicht abschließend geklärt. Zu den möglichen Ursachen können die Fehlfaltung von Proteinen, mitochondriale und Ubiquitin-Proteasom Dysfunktionen, oxidativer Stress, Neuroinflammation, Apoptose oder Umweltgifte gehören [20]. Zusätzlich wurden in den letzten Jahren vermehrt genetische Mutationen identifiziert, die im Zusammenhang mit der Entstehung eines PD stehen. Hierbei zeigten sich rezessive und dominante Erbgänge sowie eine Vielzahl von Risikogenen, welche die Entstehung von PD begünstigen, jedoch treten diese Mutationen nur in einem geringen Anteil der PD-Patienten auf [21]. Bei über 90% der Erkrankungen handelt es sich um sporadische Fälle, die als idiopathischer Morbus Parkinson bezeichnet werden [2]. Wahrscheinlich handelt es sich bei der Pathogenese der PD um einen multifaktoriellen Entstehungsmechanismus und die Endstrecke der Erkrankung stellt sich als stadienhaften Verlauf dar. Die präsymptomatischen Stadien 1 – 2 zeichnen sich durch die Anreicherung von Einschlusskörperchen in der *Medulla oblongata*, im *Tegmentum pontis*, im *Bulbus olfactorius* und im *Nucleus olfactorius anterior* aus. In den Stadien 3 – 4 kommt es in der *Substantia nigra* (SN) und weiteren Kerngebieten des Mittel- und Vorderhirns zu pathologischen Veränderungen. Schließlich, in den Endstadien 5 – 6, wird der Neokortex erreicht, woraus dann die klinische Manifestation des PD resultiert [22].

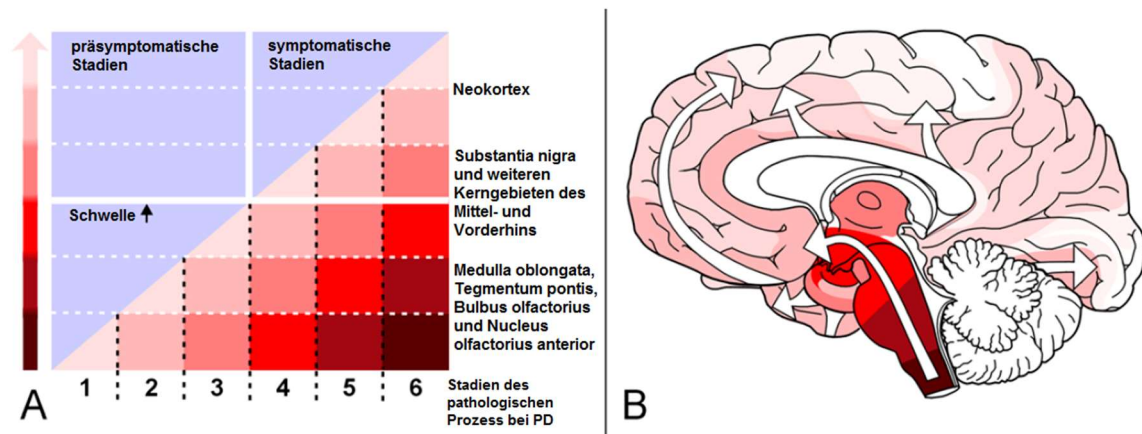


Abb. 2: Darstellung des stadienhaften Verlaufes des PD

A Die präsymptomatische Phase ist gekennzeichnet durch die Anreicherung von Lewy-Körperchen in Gehirn. Die symptomatische Phase wird bei Überschreiten der individuellen neuropathologischen Schwelle erreicht. **B** Zeigt die aufsteigenden pathologischen Prozesse (weiße Pfeile). Die Schattierung der kolorierten Areale korrespondiert zu denen aus **A**. Verändert nach Braak H *et al*, 2004 [23]

Die Ursache des selektiven Untergangs dopaminerger Neurone ist noch unbekannt. Es gibt aber Hypothesen, dass aus einem pathologischen Zusammenspiel zwischen α -Synuclein und endogenem Dopamin neurotoxische Effekte resultieren [24]. Bei α -Synuclein handelt es sich um ein kleines, lösliches Protein, das unter anderem die Ausschüttung von Dopamin reguliert [25, 26]. Der zur Formierung von Lewy-Körperchen und zur Aggregation von α -Synuclein führende Mechanismus ist noch nicht ausreichend geklärt [27]. Jedoch kann durch das, in den Lewy-Körperchen eingelagerte fehlgefaltete α -Synuclein, Mikroglia aktiviert werden und, verbunden mit der konsekutiven Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) und proinflammatorischen Mediatoren, eine Neuroinflammation in Gang gesetzt werden [28–30].

1.3 PD und das Immunsystem

Erste Erkenntnisse zur Rolle einer Neuroinflammation in der Pathologie des PD wurden in den späten Achtzigerjahren des letzten Jahrhunderts gewonnen. Damals entdeckte Mc Geer in histologischen Untersuchungen postmortaler Gehirne an Morbus Parkinson erkrankter Patienten Ansammlungen von aktivierten Mikroglia und T-Lymphozyten in der SNpc [31]. Genauere Untersuchungen zur Pathologie konnten durch die Etablierung des *in vivo* Tiermodells nach der Entdeckung von 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) durchgeführt werden. MPTP wurde erstmalig bei der unsachgemäßen Herstellung von synthetischem Heroin entdeckt, als im Jahre

1982 bei sechs *i.v.*-Drogenabhängigen nach der intravenösen Injektion von mit MPTP verunreinigtem synthetischen Heroin ein Syndrom auftrat, welches dem PD ähnelte [32, 33]. Durch den tierexperimentellen Einsatz von MPTP gelang eine differenzierte Untersuchung der Ausmaße neuroinflammatorischer Effekte im Rahmen des PD [34]. Im MPTP-Modell ließen sich CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten in der SN nachweisen [35]. Auch bei PD-Patienten wurden aktivierte Mikroglia, hochregulierte proinflammatorische Zytokine und Enzyme, wie die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und Cyclooxygenase-2 (COX-2), in den postmortalen Gehirnen PD-Erkrankter nachgewiesen [36, 37]. Darüber hinaus zeigte sich in Seren und im *Liquor cerebrospinalis* (CSF) im Vergleich zu gesunden Patienten bei PD-Patienten eine Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1beta (IL-1 β), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6) [38].

Das zentrale Nervensystem (ZNS) weist in Bezug auf Immunreaktionen Besonderheiten auf. Es zählt zu den immunprivilegierten Organen [39]. Dies bedeutet eine reduzierte Aktivierbarkeit des angeborenen und adaptiven Immunsystems. So ist es evolutionär für den Organismus günstiger eine höhere Toleranz für Fremdartigene aufzuweisen, da durch die Eliminierung des Antigens mit einem Untergang von nicht regenerationsfähigen Neuronen zu rechnen ist. Ein derartiger Untergang wäre für den Organismus nicht kompensierbar [40]. Zu den Mechanismen des Immunprivilegs des ZNS zählen unter anderen die Blut-Hirn-Schranke, die fehlenden klassischen Lymphgefäße, die Expression von Todesliganden, die die Apoptose von T-Lymphozyten induzieren, und eine veränderte Antigenpräsentation [41, 38, 42, 43]. Trotz dieser immunologischen Sonderstellung ist eine rasche Beseitigung von Krankheitserregern nötig. Hierfür besitzt das ZNS mit den Mikroglia ein eigenes residentes Immunsystem [44].

1.3.1 Mikroglia und Neuroinflammation

Mikroglia sind monozytärer Abstammung und die ortsständigen Abwehrzellen des ZNS [45]. Sie reagieren auf im Extrazellulärraum befindliche Endotoxine, Zytokine, Chemokine, fehlgefaltete Proteine und ATP. Aber auch Infektionen, Traumata, Schlaganfälle und Toxine stellen einen Aktivierungsreiz dar [46, 47, 38].

In ihrem Verhalten ähneln sie Makrophagen. Die Aktivierung der Mikroglia stellt für diese zum einen einen Proliferationsreiz dar und zum anderen sind sie nach

Aktivierung zur Phagozytose und zur Produktion von pro- und antiinflammatorischen Molekülen, wie TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10, Eicosanoide, Matrix-Metalloproteasen, oxidativer Radikale und Stickstoffmonoxid befähigt [48, 49, 28, 50]. Mit dem an ihrer Zelloberfläche exprimierten Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse II (MHC II) können sie die daran gebundenen Antigene den T-Lymphozyten präsentieren und diese zu weiteren Immunreaktionen stimulieren [51]. Im Rahmen einer Infektion im ZNS kommt es zu einer akuten Neuroinflammation, was zu einer Aktivierung von Mikroglia führen kann. Hierauf setzen die Mikroglia proinflammatorische Mediatoren frei. Ebenfalls werden neuroprotektiven Faktoren durch die Mikroglia ausgeschüttet, die den Zellschaden der Neuronen reduzieren und Reparaturmechanismen fördern [52–54]. Auch der durch die Entzündung oder Zelluntergang entstandene Zelldetritus wird durch die Mikroglia phagozytiert [55]. Somit wird die in der Akutsituation ausgelöste Immunantwort der Mikroglia begrenzt. Mikroglia sorgen neben der Beseitigung des auslösenden Agens gleichzeitig dafür, das Ausmaß des Gewebsunterganges zu reduzieren und die Heilung zu fördern. Jedoch überwiegt bei chronisch anhaltendem hohen Entzündungsniveau die Wirkung der proinflammatorischen Mediatoren mit konsekutiver Gewebszerstörung [52]. Eine Gewebszerstörung im ZNS hat verheerende Folgen. So kann untergegangenes neuronales Gewebe nicht durch die Bildung von neuen Neuronen ersetzt werden und je nach Ausmaß des Gewebsunterganges können verbleibende Funktionseinschränkungen daraus resultieren. Entzündungsreaktionen im ZNS werden als Neuroinflammation bezeichnet.

Im Rahmen einer Neuroinflammation werden durch Aktivierungsreize in den Mikroglia intrazelluläre Signalkaskaden wie der *mitogen-activated protein kinase*-(MAP) Kinase-Signalweg in Gang gesetzt, bei dem eine Reihe von Kinasen sich nacheinander gegenseitig phosphorylieren und sich damit aktivieren. Hierzu gehören die *extracellular regulated MAP kinasen* (ERK1/2). Diese sind Serin/Threonin-Kinasen und sind am Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg beteiligt. ERK1/2 werden unter anderem durch Zytokine, osmotischen Stress und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert. Intrazellulär wird durch sie eine große Anzahl von zytoplasmatischen und nukleären Substraten reguliert. Im Falle der Pathogenese des PD ist im Besonderen die Bildung des nukleären Faktors Kappa B (NF κ B) relevant. Des Weiteren haben ERK 1/2 Einfluss auf das Verhalten der Mikroglia im Rahmen einer Infektion. Sie regulieren die Zelladhäsion, den Zellzyklus, die Zellmigration, die Proliferation und die Transkription.

Kommt es zu einer Dysregulation der Ras-Raf-MEK-ERK Signalkaskade, so resultiert daraus eine überschießende Entzündungsreaktion [56, 57].

Der aktivierte Transkriptionsfaktor NF κ B transloziert vom Zytoplasma in den Zellkern der Mikroglia und erhöht die Genexpression proinflammatorischer Faktoren, wie TNF- α , IL-6, IL-1 β und proinflammatorischer Enzyme, wie die COX-2, iNOS und Matrix-Metalloprotease-9 (MMP-9) [58–60]. Durch diese vermehrte Expression proinflammatorischer Faktoren ist die Aktivierung von NF κ B ein relevanter Faktor in der Pathogenese des PD [58].

Die von aktivierten Mikroglia freigesetzten proinflammatorischen Faktoren sind an der Neuroinflammation und an der Neurodegeneration von dopaminergen Neuronen des PD beteiligt [61–66]. Das von den aktivierten Mikroglia freigesetzte TNF- α hat eine zentrale Stellung im Ablauf einer inflammatorischen Reaktion und bewirkt neben der Produktion von Zytokinen die Expression und Aktivierung von Adhäsionsmolekülen sowie die Ausbildung von Fieber, Hypotension und Schock [67]. IL-6 ist ein Schlüsselfaktor der Immunantwort und löst Entzündung und eine Akute-Phase-Reaktion aus [68]. Schon eine geringe Menge IL-1 β bewirkt ebenfalls eine Akute-Phase-Reaktion und Fieber sowie Neutrophilie und Thrombozytose. Außerdem induziert IL-1 β eine vermehrte IL-6 Freisetzung [69]. Die COX-2 synthetisiert unter anderem Prostaglandin E₂, welches zum einen die Zytokinsekretion in Mikroglia und zum anderen im Rahmen einer Entzündungsreaktion das Absterben von Neuronen fördert [70]. So konnte durch die selektive COX-2-Hemmung im Parkinson-Modell der Ratte eine verminderte Aktivierung von Mikroglia und die Reduktion des Verlustes dopaminerger Neuronen in der SNpc gezeigt werden [71]. Die iNOS ist nur unter pathologischen Umständen im Gehirn exprimiert. Sie wird hauptsächlich von aktivierten Mikroglia als Immunantwort produziert und katalysiert die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus L-Arginin. Bei pathologisch erhöhten NO-Aufkommen kann sich dieses mit Superoxid zum toxischen Peroxynitrit verbinden. Dieses kann Neuronen schädigen und zur Neurodegeneration führen [65].

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass das synthetisierte NO die Menge und die Aktivität von MMP-9 hochregulieren kann [72]. So konnte durch die Inhibition der iNOS eine verminderte MMP-9-Aktivität erreicht und somit eine Reduktion der Mikrogliaaktivierung erzielt werden [65]. Bei der MMP-9 handelt es sich um eine zinkabhängige Endopeptidase. Sie baut Extrazellulärmatrix und weitere Proteine ab und ist relevant bei der synaptischen Plastizität, Angiogenese und Gedächtnisbildung.

Eine Überaktivität steht im Zusammenhang mit dem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke, dem Absterben von Neuronen und der Neuroinflammation [73]. Die MMP-9 scheint in den frühen Stadien des PD zu pathologischen Veränderungen zu führen. In der Untersuchung von postmortalen Gehirnen PD-Erkrankter zeigten sich keine erhöhte MMP-9-Level, jedoch war die Konzentration von Gewebeinhibitoren für MMP-9 im Liquor erhöht [60, 74, 75, 73].

Zusammenfassend stellt die Einbeziehung des Immunsystems in die Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen und insbesondere bei der Behandlung des PD einen vielversprechenden Ansatzpunkt für zukünftige Therapien dar.

1.4 Harnsäure und PD

Die Harnsäure (HS) ist in Hominiden das Endprodukt des Purinabbaues. Purine sind, als die Purinbasen Adenin und Guanin, Bestandteile der Nukleinsäuren und fallen sowohl durch den eigenen Metabolismus im Körper als auch durch die in der Nahrung enthaltenen Nukleinsäuren an [76]. Lange Zeit betrachtete man die HS nur als Auslöser der Gicht und von Gefäßerkrankungen. Dies hat sich in den vergangenen Jahrzehnten geändert. Immer mehr Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die HS noch weitere Funktionen im Organismus erfüllt und nicht nur ein Abfallprodukt ist. So zeigten Menschen mit einer erhöhten HS-Plasmakonzentration ein niedrigeres Risiko, an einem PD zu erkranken oder bei einem bestehenden PD zeigte sich eine verzögerte Progredienz der Erkrankung [77, 78, 77, 79]. Dem folgend wiesen PD-Patienten einen reduzierten HS-Spiegel im Serum und im CSF auf und selbst mit Fortschreiten des PD sanken die primär bereits erniedrigten HS-Spiegel weiter ab [80, 81, 82].

Doch wie kann HS auf die Progredienz der PD Einfluss nehmen? Hier ist zum einen die chemische Eigenschaft der HS relevant. Unter physiologischen Bedingungen kann oxidativer Stress im menschlichen Organismus durch HS als endogenes Antioxidans reduziert und somit eliminiert werden. So wird mehr als die Hälfte der antioxidativen Kapazität des Blutplasmas durch HS bewirkt [83, 84].

Der Untergang dopaminergischer Neurone kann unter anderem auf einen erhöhten oxidativen Stress zurückgeführt werden und HS ist aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften im Stande, oxidativen Stress zu reduzieren [85, 86].

Gibt es hier vielleicht einen Zusammenhang zwischen dem HS-Plasmaspiegel und dem Verlauf eines PD oder hat HS auf Mikroglia direkte Auswirkungen? Ist gar ein

reduzierter HS-Spiegel im CSF bereits ein Risikofaktor für die Entstehung eines PD? Diese Fragen und die, warum im Rahmen einer PD-Erkrankung der HS-Spiegel absinkt, sind noch ungeklärt [87].

1.4.1 HS im Organismus

Die durch den Metabolismus und über die Nahrungsaufnahme anfallenden Purinbasen werden zu HS verstoffwechselt. Dabei wird das Adenosinmonophosphat zunächst zu Hypoxanthin umgewandelt. Anschließend wird in zwei weiteren Reaktionen, die durch die Xanthinoxidase katalysiert werden, Hypoxanthin zu Xanthin und dann zur HS umgewandelt.

Das Guanosinmonophosphat wird zunächst über zwei Zwischenreaktionen zu Guanin. Das hierbei durch die Guanin-Deaminase entstandene Xanthin wird mittels Xanthinoxidase zu HS [76]. So fallen pro Tag allein aus der endogenen HS-Produktion ca. 300 bis 400 mg HS an [76]. Neben der endogenen HS-Produktion erhöht sich durch Alimentation der HS-Spiegel. Hier sind im Besonderen die Aufnahme von Fruktose, gesüßten Getränken sowie eine purinreiche Ernährung, Proteindiäten und Alkoholkonsum zu nennen [88, 89, 90].

Die HS hat eine geringe Löslichkeit in Wasser und die durchschnittliche HS-Konzentration bei Menschen im Blut liegt im Bereich der Löslichkeitsgrenze bei etwa 6,8 mg/dl [76]. Die Referenzbereiche des HS-Spiegels im Blut sind je nach Geschlecht unterschiedlich. Bei Frauen liegt dieser in einem Bereich von 1,5 bis 6,0 mg/dl, bei Männern von 2,5 bis 7,0 mg/dl [76]. Um hierbei die HS-Konzentration im Plasma konstant zu halten, werden 70% der täglichen HS-Produktion über die Niere eliminiert. Somit ist die Niere das Hauptausscheidungsorgan für HS. Damit dem Körper nicht zu viel HS über die Niere entzogen wird, besitzen die proximalen Tubuli der Niere spezialisierte Transportproteine, die die Rückresorption der HS ermöglichen. Da die HS im proximalen Tubulus in seiner anionischen Form nicht allein zurück ins Plasma diffundieren kann, liegen dort HS-transportierende Kanäle wie URAT 1 vor [91]. Hierbei ist die Rückresorption von HS so effizient, sodass lediglich 10% der filtrierten HS eliminiert werden [92].

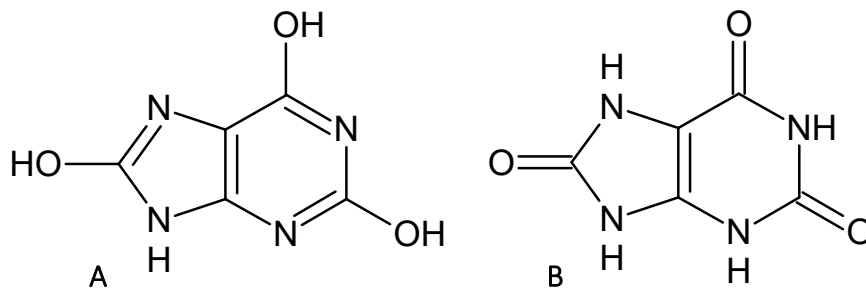


Abb. 3: Chemische Struktur von Harnsäure. Harnsäure hat die Summenformel $C_5H_4N_4O_3$ [76]. Strukturell besteht Harnsäure aus einem aromatischen Sechsring, an den sich ein Fünfring anfügt. Hier substituieren vier Stickstoff-Atome die Kohlenstoff-Atome an Positionen 1, 3, 7 und 9. Die Kohlenstoff-Atome 2, 6 und 8 binden in der Lactimform (A) Hydroxy- und in der Lactamform (B) Oxogruppen.

HS ist ein starkes Antioxidans und Fänger von Singulett-Sauerstoff und freien Radikalen. Hier hat es eine ähnliche Effektivität wie Ascorbinsäure. Die hohe HS-Plasmakonzentration macht es zum hauptsächlichen Antioxidans im menschlichen Körper [93, 94]. Des Weiteren vermag HS, NO direkt zu inaktivieren [95].

Im CSF beträgt die HS-Konzentration bei Frauen 0,25 mg/dl und bei Männern 0,34 mg/dl [96]. Der im Vergleich zu Serum niedrigere HS-Spiegel im CSF könnte an spezialisierten Transportsystemen im Rahmen der Bluthirnschranke liegen. Studien an Rattenhirnen zeigen eine Expression von URAT 1 in der apikalen Membran von ventrikulären Ependymzellen, das könnte für den HS-Transport zwischen CSF und Gehirnparenchym verantwortlich sein [97].

Im Gegensatz zum Menschen bewirkt bei anderen Säugetiere das Enzym Uricase die Umwandlung von HS in das wasserlöslichere Allantoin. Diese Möglichkeit ist bei Hominiden im Verlauf der Evolution eliminiert worden [98, 99]. Das Fehlen einer funktionierenden Uricase und das Vorliegen eines effektiven renalen Anionentransports führt zu einem höheren HS-Spiegel bei Hominiden im Vergleich zu anderen Säugetieren und könnte einen evolutionären Vorteil darstellen.

1.4.2 HS: Zweischneidiges Schwert des Immunsystems

Mit dem Vergleich der Rolle von HS in neurodegenerativen Erkrankungen mit einem zweischneidigen Schwert wies Pu Fang in seinem 2013 erschienen Zeitungsbeitrag auf die duale Bedeutung der Harnsäure im entzündlichen Geschehen hin [100]. Übersteigt der HS-Plasmaspiegel seine Löslichkeitsgrenze, fällt HS als Mononatrium-Urat-Kristall aus. Eine über der Norm erhöhte HS-Konzentration im Körper wird als

Hyperurikämie bezeichnet. Ablagerungen von HS in Gelenken oder in ihnen anliegenden Geweben können zur Gichtarthritis führen. Nach längerem Verlauf können sich Tophi entwickeln. Hierbei handelt es sich um knotenartige HS-Kristallablagerungen, die häufig in den Gelenken oder deren Nähe, aber auch am gesamten Körper entstehen können [101, 102]. Darüber hinaus besteht eine Assoziation von erhöhtem HS-Spiegel mit oxidativem Stress, endothelialer Dysfunktion, Entzündung und Artherosklerose mit erhöhtem Risiko kardiovaskulärer Ereignisse, aber auch von Nierensteinen und Nierenerkrankungen [103, 104]. So stellt sich unter anderem beim therapeutischen Einsatz von HS im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen die Aufgabe, eine Konzentration zu wählen, die ein antientzündliches Potenzial entfaltet, ohne die Formierung von Mononatrium-Urat-Kristallen zu fördern.

1.4.3 HS als Disease-modifying Drug?

In den letzten Jahren wurden bereits Untersuchungen zur Effektivität von HS bei neuroinflammatorischen Erkrankungen durchgeführt. So konnte durch die exogene Applikation von HS im Multiple Sklerose-Modell bei Mäusen ein starker therapeutischer Effekt erzielt werden. Die im Rahmen des Multiple Sklerose-Tiermodells an der experimenteller autoimmunen Enzephalomyelitis leidenden Mäuse erhielten täglich eine gewichtsadaptierte intravenöse HS-Injektion. Behandelte Mäuse zeigten ein verzögertes Auftreten der Erkrankung und ein längeres Überleben als die Kontrollgruppe [105].

Für den Einsatz bei Patienten besteht eine sichere orale Applikationsform. PD-Patienten wurde Inosin in Tablettenform verabreicht, um eine Erhöhung der Serumharnsäurespiegel auf 6,1 – 8,0 mg/dl zu erreichen. Inosin besteht aus dem Zucker β -D-Ribofuranose und der Purinbase Hypoxanthin. Inosin führt hierbei nach oraler Aufnahme zu einer 1,2-fachen Erhöhung der Serumharnsäurekonzentration [107]. Alle untersuchten Dosierungen zeigten eine gute Verträglichkeit, ohne erhöhtes Auftreten von Gicht und kardiovaskulären Erkrankungen [106]. Bereits in prospektiven Kohortenstudien konnte gezeigt werden, dass HS einen direkten hemmenden Einfluss auf die Progression von PD ausübt, wobei dieser Effekt bei männlichen Studienteilnehmern stärker ausgeprägt war als bei Frauen [108].

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit soll erstmalig der Einfluss von HS auf die Aktivierung, die Proliferation, die Expression von inflammatorischen Zytokinen und Enzymen und auf daran beteiligte intrazelluläre Signalkaskaden in primären Mikroglia *in vitro* untersucht werde.

Zur Beurteilung einer möglichen immunmodulatorischen Wirkung von HS werden die Mikroglia mit LPS, einem anerkannten *in vitro* Modell zur Aktivierung von Mikroglia, stimuliert und die Effekte von HS auf aktivierte und nicht aktivierte Mikroglia gemessen und verglichen [112]. Dafür soll zuerst eine nicht zytotoxische, aber wirksame, Konzentration von HS experimentell mittels eines Zytotoxizitätstestes ermittelt werden, mit der dann alle weiteren Untersuchungen durchgeführt werden.

In dieser Doktorarbeit sollen folgende Fragen geklärt werden:

- In welcher Konzentration übt HS einen Einfluss auf Mikroglia aus, ist aber nicht zytotoxisch?
- Beeinflusst HS das Proliferationsverhalten der Mikroglia?
- Lässt sich mit der Zugabe von HS zu LPS- aktivierten Mikroglia die Entzündungsreaktion der Mikroglia reduzieren?
- Welche Signalwege sind daran beteiligt?
- Hat Harnsäure das Potential, neuroprotektiv zu wirken?

2 Material

2.1 Geräte

7500 Fast Real-Time PCR System Applied Biosystems®	Life Technologies, USA
Axiovert 200 M Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen
Axiocam MRm Fotokamera	Carl Zeiss, Oberkochen
Blot-Kammer Trans-Blot® Turbo™ System	BIO-RAD, USA
Zentrifuge 5430	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresekammer Mini-Protean® 3 Cell	BIO-RAD, USA
Fusion SL	Vilber Lourmat, Frankreich
Gefrierschrank (-20 °C) Economic	Bosch, München
Gefrierschrank (-80 °C) Herafreeze	Heraeus-Instruments, Hanau
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, USA
Inkubator HERA cell 150	Heraeus-Instruments, Hanau
Kreisschüttler RO 10	C. Gerhardt, Königswinter
Kühlschrank KT 1730	Liebherr, Biberach an der Riss
Magnetrührer MR 2002	Heidolph-Instruments, Schwabach
Microplate Spectrophotometer Epoch™	BioTek Instruments, USA
Mikroskop	Wilovert, Wetzlar
MiniSpin	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer (0,0025 cm ² , Tiefe 0,1 mm)	Roth, Karlsruhe
Photometer EAR 340 ATTC	SLT-Laborinstrumente, Österreich
Photometer ELISA GENios-basic	TECAN, Österreich
Pipetten (1 – 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot Turbo	BIO-RAD, USA
Ultraschallbad Sonorex RK 100	Bandelin electronic, Berlin

Stereomikroskop
Sterile Werkbank HERA safe®

Take3 Multi Volume Plate
Taumelrollenmischer RM 5

Thermomixer compact
Präzisionswaage
Wasserbad

Carl Zeiss, Oberkochen
Heraeus-Instruments,
Hanau
BioTek Instruments, USA
Glaswagenfabrik Karl
Hecht, Sondheim v.d. Röhn
Eppendorf, Hamburg
Sartorius, Göttingen
Köttermann,
Uetze/Hänigsen

2.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser, Ø 12 mm
ELISA 96-Loch-Mikrotiterplatten
Gewebekulturschälchen (60 x 15 mm)
Multiply 96-well qPCR-Platte
Pipettenspitzen, verschiedene Größen
Reaktionsgefäße (0,2; 0,5; 1,5 ml)
Objektträger, SuperFrost Plus
PVDF-Membran Amersham™ Hybond™
Whatman-Pappe™
Zellkulturflaschen mit Filterdeckel, 75 cm² Grundfläche
Zellkulturplatten (6, 12, 24 oder 96 Vertiefungen)
Zellschaber
Zentrifugenröhrchen (10 ml und 50 ml)

Carl Roth, Karlsruhe
BD Biosciences, USA
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Menzel, Braunschweig
GE Healthcare, UK
GE Healthcare, UK
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Azeton
Acrylamid
Ammoniumpersulfat (APS)
Bisbenzimid
Bio-Rad Protein Assay
Bovines Serumalbumin (BSA)

Merck, Darmstadt
Serva, Heidelberg
Fisher Scientific, USA
Sigma-Aldrich, USA
BIO-RAD, USA
Serva, Heidelberg

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, USA
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, USA
Dulbeccos's PBS (Ca ²⁺ und Mg ²⁺ frei) (DPBS)	PAN Biotech, Aidenbach
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies, USA
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	Life Technologies, USA
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
β-Glycerol-Phosphat	Sigma- Aldrich, USA
Glycogen	Sigma-Aldrich, USA
Griess-Reagenz	Sigma-Aldrich, USA
Harnsäure (2,6,8-Trihydroxypurine)	Sigma-Aldrich, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, USA
(2-4-2-Hydroxyethyl-1-piperazinyl-Ethansulfonsäure)	
Immu-Mount Eindeckmedium	Thermo-Scientific, USA
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kasein (Magermilchpulver)	Heirler Cenovis, Radolfzell
Kristallviolett	Walter, Kiel
L-Glutamin	PAN Biotech, Aidenbach
LPS (Lipopolysaccharid (<i>Salmonella typhimurium</i>))	Sigma- Aldrich, USA
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natronlauge (NaOH (1 N))	Carl Roth, Karlsruhe
Natrium-Pyrophosphat	Sigma- Aldrich, USA
Natrium-Vanadat	Sigma- Aldrich, USA
Natriumduodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
PBS	PAN BioTech, Aidenbach
Penicillin/ Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach
Phenylmethylsulfonyl Fluoride	Sigma- Aldrich, USA
RNAse freies Aqua bidest	Anatomisches Institut, Kiel

Schwefelsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure (1 N)	Carl Roth, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma- Aldrich, USA
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma- Aldrich, USA
TRIS-HCL	Carl Roth, Karlsruhe
Tryptanblau	Sigma- Aldrich, USA
Trizol	Qiagen, USA
Trypsin	Sigma- Aldrich, USA
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe

2.4 Lösungen und Puffer

Dissoziationslösung	0,024 g HEPES 0,020 g Trypsin 0,002 g EDTA 35 µl DNase (1 mg/ml) <i>ad 10 ml DMEM</i>
Elektrodenpuffer/ Laufpuffer (pH 8,2 - 8,3)	12,2 g TRIS 57,6 g Glycin 4 g SDS <i>ad 4 ml Aqua bidest</i>
Gelpuffer I (pH 8,8)	45,43 g TRIS 1 g SDS <i>ad 250 ml Aqua bidest</i>
Gelpuffer II (pH 6,8)	15,10 g TRIS 1 g SDS <i>ad 250 ml Aqua bidest</i>
Zellkulturmedium	500 ml DMEM (4,5 g Glucose/l) 60 ml FKS (bei 44-53 °C für 30 min inaktiviert) 5 ml L-Glutamin (200 mM)

	6 ml Penicillin (10.000 U/ml) und Streptomycin (10 mg/ml) in PBS
Stimulationsmedium	500 ml DMEM (4,5 g Glucose/l) 60 ml FKS (bei 56°C für 30 min inaktiviert) 5 ml L-Glutamin (200 mM) 6 ml Penicillin (10.000 U/ml) und Streptomycin (10 mg/ml) in PBS
Lauffrontanzeige	Bromphenolblau, gesättigte Lösung
Lysis-Puffer	50 mM TRIS pH 7,5 100 nM NaCl 5 nM EDTA 1% Triton x-100 2,0 mM Natrium-Vanadat 2,5 mM Natrium-Pyrophosphat 1 mM β -Glycerol-Phosphat 1 mM Phenylmethylsulfonyl - Fluoride
Sammelgel	2,6 ml Gelpuffer II 1,67 ml Acrylamid 5,79 ml <i>Aqua bidest</i> 60 μ l APS 10% 30 μ l TEMED
SDS-Probenpuffer (pH 8)	0,23 g SDS 1,25 ml Gelpuffer II 1 ml Glycerin 50 mM DTT 10 ml <i>Aqua bidest</i>

Solubilisierungslösung (pH 2)	60 g SDS 7,5 ml Essigsäure 80% 7,5 ml (1 N) Salzsäure 210 ml 50% DMF Lösung <i>ad</i> 300 ml <i>Aqua bidest</i>
Stammlösung Harnsäure (5 mM)	0,84055 mg/ml Harnsäure 1 ml (1 N) NaOH für 10 min im Ultraschallbad, anschließend 30 min auf 50 °C erhitzt
TBS-T Puffer (pH 7,5)	20 mM TRIS 0,14 M NaCl 1 mM EDTA 0,1% Tween 20
Transfer-Puffer (pH 9)	7,5 g TRIS 36,03 g Glycin 250 ml Methanol
Trenngel	2,6 ml Gelpuffer I 3,33 ml Acrylamid 4,03 ml <i>Aqua bidest</i> 60 µl APS 10% 30 µl TEMED

2.5 Kits

BD OptEIA™ Rat TNF-α ELISA Set	Biosciences, USA
BD OptEIA™ Rat IL-6 Set	Biosciences, USA
dNTP-Mix (10 nm)	5 Prime, Hilden
ECL Kit Amersham®	GE Healthcare, UK

Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, USA
cDNA-Synthese Kit	Promega, USA
RQ1 RNase-Free DNase-Kit	Promega, USA
SuperSignal West Femto-Kit™	Thermo Scientific, USA
TaqMan® Universal PCR Master-Mix	Life Technologies, USA

2.6 Enzyme

RevertAid H Minus reverse Transkriptase	Thermo Scientific, USA
RNase-freie DNase I (10 U/μl)	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Thermus Aquaticus</i> DNA(TaqMan®) Polymerase (5 U/l)	Life Technologies, USA

2.7 Primer

Random Hexamer Primer	Thermo Scientific, USA
-----------------------	------------------------

2.8 TaqMan®-Assay on Demand (Life Technologies)

COX-2	Rn00568225_m1
Eukaryotische 18s RNA	Hs99999901_s1
Induzierbare NO-Synthase (iNOS)	Rn00561646_m1
Interleukin-1β	Rn00580432_m1
Interleukin-6	Rn00561420_m1
MMP9	Rn00579162_m1
TNF-α	Rn99999017_m1

2.9 Antikörper

2.9.1 Primärantikörper

Anti-MAP Kinase 2/ERK2, Clone 1B3B9	Merck Millipore, USA
Phospho-p44/42 MAPK (ERK 1/2)-Antikörper - (Thr 202/Tyr 204) PTM Rabbit mAB	Cell Signaling Technologies, USA

P38 MAPK Antibody

Cell Signaling Technologies,
USA

Phospho-p38 MAPK (pp38)-Antikörper
(Thr 180/ Tyr 182)

Cell Signaling Technologies,
USA

2.9.2 Sekundärantikörper

Goat-anti-rabbit-IgG-HRP linked Antibody

Cell Signaling Technologies,
USA

Donkey-anti-mouse-IgG-HRP

Santa Cruz, USA

2.10 Primäre Mikroglia

Primäre Mikroglia wurden aus den Gehirnen von postnatalen Ratten der Rasse Sprague Dawley gewonnen. Verwendet wurden Tiere des 1. bis 2. postnatalen Tages. Sie entstammten der Eigennachzucht des Victor-Hensen-Tierhauses der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

2.11 Computersoftware

Graph Pad Prism 5

Graph Pad Software, USA

Realtime PCR 7500 Software v2.0.6

Applied Biosystems, USA

FusionCapt Advance SL4 16.09b

Vilber Lourmat, Frankreich

Gen5 1.10.8

BioTek Instruments, USA

Zusatzmodule Diagnostics 1.06.1, Take3 1.00.2

BioTek Instruments, USA

ELISA Magellan v5.03

TECAN, Österreich

AxioVision Rel. 4.8

Carl Zeiss, Oberkochen

MS Excel

Microsoft, USA

MS Word

Microsoft, USA

Pages

Apple Inc., USA

Numbers

Apple Inc., USA

ACD/ChemSketch (Freeware) 2015

ACD/Labs, Kanada

3 Methoden

3.1 Isolierung und Kultivierung primärer Mikroglia

3.1.1 Präparation der Versuchstiere

Es wurden 10-12 postnatale Ratten (p1 – p2) dekapitiert, die Gehirne entnommen und in Gewebekulturschälchen mit sterilem DPBS, supplementiert mit 1% Penicillin/Streptomycin, überführt. Die Genehmigung zur Organentnahme erfolgte durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein (V 312 - 7224.121 – 13). Unter einem Binokular wurden zunächst bei jedem Gehirn die Großhirnkortizes von den Meningen befreit und jeweils die Kortizes sowie das Mesencephalon freipräpariert. Die übrigen Hirnareale wurden verworfen. Die so gewonnen Kortizes und Mesencephali wurden mechanisch mit einem Skalpell zerkleinert. Im Anschluss wurde das zerkleinerte Gewebe von je 4 – 5 Kortizes sowie je 5 – 6 Mesencephali in separate 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und enzymatisch dissoziiert. Dies erfolgte durch die Zugabe von 3 ml Dissoziationslösung und anschließender 30-minütiger Inkubation bei 37°C im Inkubator. Nach der Inkubationszeit wurden die Überstände vorsichtig abgesaugt und zu den Ansätzen jeweils 2 ml FKS-haltiges Zellkulturmedium sowie 50 µl DNase I (1mg/ml) hinzugefügt, um hiermit die Trypsin-Aktivität der Dissoziationslösung zu stoppen und die Vereinzelung der Zellen enzymatisch vorzubereiten. Anschließend wurden die Zellen mechanisch durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren durch feuerverengte Pasteurpipetten vereinzelt und in Zellkulturflaschen (75 cm² Grundfläche) in jeweils 10 ml Zellkulturmedium überführt. Hierbei wurden je Zellkulturflasche die isolierten Zellen aus zwei dissoziierten Mesencephali oder einer Kortexhälfte in separate Zellkulturflaschen ausgesät, da die Zellen aus den verschiedenen Hirnarealen unterschiedliche Wachstumseigenschaften besitzen. Diese Zellkulturen wurden im Inkubator bei 37 °C und 8,4% wasserdampfgesättigter CO₂- Atmosphäre unter zweitägigem Wechsel des Zellkulturmediums bis zur Ernte der primären Mikroglia inkubiert.

3.1.2 Ernte primärer Mikroglia

Nachdem die unter 3.1.1. beschriebenen Mischkulturen konfluent gewachsen waren, wurden die Mikroglia geerntet. Hierfür wurden die Zellkulturflaschen manuell geschüttelt, um die Mikroglia aus dem adhären Astrozytenrasen zu lösen, sodass sich in dem Zellkulturüberstand nun die isolierten Mikroglia befanden. Anschließend wurde der Überstand mit den Mikroglia jeweils in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1000 x g zentrifugiert. Hiernach befanden sich die Mikroglia als Zellpellet am Boden des Zentrifugenröhrchens. Der Überstand wurde durch Dekantieren entfernt und das Zellpellet im verbliebenen Restmedium resuspendiert. Nach der Vereinigung aller isolierten Mikroglia in ein gemeinsames Zentrifugenröhrchen, wurde die Zellzahl bestimmt. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gefärbt und von diesem Ansatz 10 µl in einer Neubauer-Zählkammer mikroskopisch untersucht und die lebenden, ungefärbten Zellen ausgezählt.

3.1.3 Aussaat der Mikroglia

Die Mikroglia wurden für anschließende Versuche jeweils in der nachfolgend angegebene Zelldichte ausgesät und für ca. 24 h im Inkubator bei 37 °C und 8,4% CO₂- Begasung gehalten, um ein Anheften der adhären wachsenden Mikroglia am Boden der Zellkulturplatte zu erreichen.

MTT-Test:	100.000 Mikroglia in 200 µl Zellkulturmedium je Ansatz (96er-Mikrotiterplatte mit Flachboden)
NO-Messung:	100.000 Zellen in 200 µl je Ansatz (96er-Mikrotiterplatte mit Flachboden)
Proliferationstest:	200.000 Zellen in 200 µl je Ansatz (96er-Mikrotiterplatte mit Flachboden)
qPCR und ELISA:	1.000.000 Zeillen in 1 ml Zellkultumedium je Ansatz (12er-Zellkulturplatte)
Westernblot:	1.000.000 Zellen in 1 ml Zellkulturmedium je Ansatz (12er-Zellkulturplatte)

3.2 Stimulation der Mikroglia

Vor der Stimulation der Mikroglia für die jeweiligen Versuche wurde das Zellkulturmedium von den ausgesäten Mikroglia vorsichtig abgesaugt und die Versuchsansätze folgendermaßen behandelt:

Stimulationsprotokoll:

Ansatz 1: Zellstimulationsmedium als unstimulierte Kontrolle

Ansatz 2: 5 ng/ml LPS in Zellstimulationsmedium als Aktivierungskontrolle

Ansatz 3: 10 µM HS in Zellstimulationsmedium

Ansatz 4: 10 µM HS + 5 ng/ml LPS in Zellstimulationsmedium

Alle Versuchsansätze, die HS enthielten, wurden mit dieser für 30 min vorinkubiert, bevor LPS zu dem doppelt stimulierten Ansatz pipettiert wurde und die eigentliche Inkubationszeit, die nachfolgend für die einzelnen Versuche angegeben ist, begann.

3.3 Zellbiologische Untersuchungen

3.3.1 Zytotoxizitätstest

Um den Einsatz einer möglichen zytotoxischen Konzentration von HS in den Versuchsansätzen zu verhindern, wurde im Vorfeld ein Thiazolyl-Blue-Tetrazolium-Bromide (MTT)-Tests durchgeführt. Bei diesem werden von den behandelten vitalen Zellen die gelbe Substanz MTT von der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase und die NADH- sowie NADPH- abhängigen Enzymen des Endoplasmatischen Retikulums in blau-violettes wasserunlösliches Formazan reduziert [109]. Die Menge des gebildeten Farbstoffes kann photometrisch gemessen werden und entspricht dabei der Rate der Glykolyse der Zellen und lässt Rückschlüsse auf das Überleben der Zellen zu.

In dieser Arbeit wurde eine mögliche Zytotoxizität von HS in einer Konzentration von 0,1 µM, 1 µM, 10 µM und 100 µM mit und ohne die gleichzeitige Behandlung mit 5 ng/ml LPS untersucht. Dafür wurden die in 5-fach Replikaten ausgesäten Mikroglia entsprechend des um die o.g. HS- Konzentrationen erweiterten Stimulationsprotokolls behandelt und für 24 h im Inkubator bei 37 °C und 8,4% CO₂- Begasung inkubiert. Vor der Durchführung des MTT-Tests wurden die Mikroglia zunächst mit einem Mikroskop

auf Auffälligkeiten hin durchmustert, bevor die Zellüberstände abgesaugt und jeder Ansatz dreimal mit 200 µl sterilem DPBS gewaschen wurde. Im Anschluss wurden 100 µl Stimulationsmedium zu den Versuchsansätzen pipettiert und jeweils 25 µl sterile MTT-Lösung hinzu pipettiert. Dann wurden die Ansätze für 120 min im Inkubator bei 37 °C und 8,4% CO₂- Begasung inkubiert, bevor 100 µl Solubilisierungslösung zu den Ansätzen pipettiert und diese erneut für 120 min inkubiert wurden. Zum Schluss wurden die Ansätze mit einem Rührstäbchen durchmischt bis sich die gebildeten Formazankristalle vollständig aufgelöst hatten und die Absorption im Photometer bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen.

3.3.2 Proliferationstest

Zur Untersuchung des Einflusses von HS auf das Proliferationsverhalten der Mikroglia wurden diese mit Kristallviolett behandelt, welches DNA blau anfärbt. Anhand der photometrisch gemessenen Farbintensität lassen sich dann mittels einer Standardkurve indirekt Rückschlüsse auf die Zellzahl ziehen.

Für diesen Versuch wurden die Mikroglia entsprechend des Stimulationsprotokolls für 24 h stimuliert und anschließend die Zellen durch die Zugabe von je 25 µl Glutardialdehydlösung (10%) für 20 min bei leichtem Schütteln bei Raumtemperatur am Boden der Zellkulturplatte fixiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen der Platte unter fließendem *Aqua bidest*. Nach anschließender Lufttrocknung erfolgte die Färbung der DNA in den fixierten Mikroglia mit je 100 µl Kristallviolett (N-hexamethylparaosanilin) (0,1% in *Aqua bidest*, pH 4,5) für 20 min bei Raumtemperatur. Nach Beendigung der Inkubationszeit und 3-maligem Waschen der Zellen mit *Aqua bidest* mit anschließender Lufttrocknung wurde in jede Vertiefung jeweils 100 µl Essigsäure (10%) pipettiert und die Platte kurz geschüttelt. Im Anschluss wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm die Extinktion photometrisch analysiert. Zur Beurteilung der Ergebnisse wurden bei jeder Untersuchung folgende Standardwerte 100.000, 200.000, 300.000, 400.000 und 500.000 unstimulierte Mikroglia mitgeführt. Aus den hierbei gemessenen Extinktionen wurde eine Standardreihe erstellt, zu der die Versuchsergebnisse ins Verhältnis gesetzt wurden.

3.3.3 Indirekte Stickstoffmonoxid-Messung

NO wird in aktivierten Mikroglia durch die iNOS synthetisiert und freigesetzt und diente in dieser Arbeit als Indikator für eine Mikroglia-Aktivierung. Da NO ein stark flüchtiges Gas ist, wurde es indirekt mittels Griess-Reagenz gemessen. Das Griess-Reagenz bewirkt bei dieser Reaktion zunächst die Bildung von stabilem Nitrit (NO_2^-) aus NO. Das Nitrit bildet einen Komplex mit dem Sulfanilamid, einer Komponente des Griess Reagenz. Dieser Komplex reagierte mit der zweiten Komponente des Griess-Reagenz, dem Naphtylethylamin, zu einem violetten Azoprodukt [113], welches photometrisch gemessen werden kann.

Für den Versuch wurden 100 μl des Zellkulturüberstandes jedes Versuchsansatzes mit 100 μl Griess-Reagenz in einer 96-Mikrotiterplatte mit Flachboden gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Intensität der gelben Farbbildung als Nitritnachweis am Photometer bei einer Wellenlänge von 540 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen.

3.4 Molekularbiologische Untersuchungen

3.4.1 Isolierung der Gesamt-RNA für die qPCR

Die Isolierung der zellulären Gesamt-RNA erfolgte durch die Einzelschrittmethode nach Chomczynski und Sacchi mittels Trizol [128]. Hierbei werden sich die unterschiedlichen Löslichkeiten der zu extrahierenden Substanzen in einer zweiphasigen Emulsion zunutze gemacht. Trizol, als ein Gemisch aus dem chaotropen Salz Guanidinisothiocyanat (GTC), welches die Zellen lysiert und gleichzeitig die RNase sowie weitere Enzyme inaktiviert, und Phenol, in welchem sich DNA und Proteine lösen.

Zunächst wurden die Zellen lysiert. Hierzu wurden der Zellkulturüberstand der Versuchsansätze abgesaugt und die Mikroglia zweimal mit DPBS gewaschen. Nach der Zugabe von 1 ml Trizol je Ansatz folgte die mechanische Zellablösung mit einem sterilen Zellschaber. Das hier entstandene Lysat wurde jeweils in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Darauffolgend wurden 200 μl Chloroform je Versuchsansatz hinzugefügt und für 15 s manuell kräftig geschüttelt und für weitere 2 - 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Zentrifugation bei 12.000 x g und 4 °C über 15 min bewirkte eine Phasentrennung in drei Phasen: In der oberen wässrigen Phase befand sich die RNA,

darunter folgte eine Interphase (DNA und Proteine) und eine untere rötliche organische Chloroform-Phenol-Phase (DNA und Proteine). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und dazu 1 µl Glykogen (70 mg/ml) hinzu pipettiert. Anschließend erfolgte eine Präzipitation der RNA durch die Zugabe von je 500 µl Isopropanol zu den Versuchsansätzen. Im Anschluss einer weiteren Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur wurden die Ansätze für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Hierdurch setzte sich die RNA als gelartiges Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes ab. Der flüssige Überstand wurde entfernt und das RNA- Pellet mit 1 ml 75% Ethanol durch Schütteln und anschließende Zentrifugation über 5 min bei 7.500 x g und 4 °C gewaschen. Der Überstand wurde verworfen. Das am Boden des Reaktionsgefäßes entstandene Pellet wurde kurz luftgetrocknet und in 20 µl RNase-freiem *Aqua bideest* eluiert und sodann für 10 min bei 57 °C inkubiert. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden 2 µl der Probe und als Leerwert 2 µl *Aqua bideest* auf eine „Take3 Multi Volume Plate“ pipettiert. Die Proben wurden photometrisch im Epoch Mikroplatten-Spektralphotometer gemessen und die Gesamt-RNA mit der Analysensoftware Gen5 quantifiziert.

Die Reinheit der RNA sollte bei einem Wert von 1,7-2,0 liegen. Die RNA wurde anschließend bei -70 °C verwahrt.

3.4.2 Synthese der komplementären DNA (cDNA)

Die isolierte mRNA wurde mittels der reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Dies ermöglicht eine anschließende Amplifizierung im qPCR-Verfahren. Vor der eigentlichen cDNA-Synthese erfolgt ein DNA-Verdau gemäß der Anleitung des DNase-Kits, dies diente der Vermeidung einer Kontamination mit Fremd-DNA.

Für den DNA-Verdau wurden zunächst ein Reaktionsansatz angesetzt, der aus 8 µl Probe (1 µg mRNA in 8 µl *Aqua bideest*), 1 µl DNase Puffer sowie 1 µl RQ1-RNase free-DNase bestand. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation für 15 min bei 37 °C im Thermocycler (GenAmp PCR System 2400). Anschließend wurde die Probe auf Eis gestellt. Die Aktivität der DNase wurde durch die Zugabe von 1 µl RQ1 DNase *Stop Solution* (25 mM EDTA) und zehnminütiger Inkubation bei 65 °C gestoppt.

Die cDNA-Synthese (Reverse Transkription) erfolgte gemäß der Anleitung des cDNA-Synthese-Kits. Zu den Proben wurden hierfür zuerst je 1 µl des Random Hexamer Primer-Gemisches hinzugefügt und für 5 min bei 70 °C im Thermocycler inkubiert. In

dieser Zeit hybridisieren die einzelsträngigen Nukleotidsequenzen des Primergemisches an die korrespondierenden komplementären Basenpaare der mRNA und bilden hiermit den Startpunkt der Reversen Transkriptase. Anschließend wurden zu jeder Probe 4 µl 5 x Reaktionspuffer, 1 µl *Aqua bideest* und 2 µl dNTP-Mix (10 mM) hinzugefügt und für 5 min bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss wurde zu den Proben 1 µl der Reversen Transkriptase pipettiert und diese im Thermocycler zuerst für 10 min bei 25 °C (Primer-Annealing), dann für 60 min bei 42 °C (Reverse Transkription) und abschließend für 10 min bei 70 °C (Enzyminaktivierung) inkubiert. Die so synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C für höchstens 6 Monate bis zur Verwendung verwahrt.

3.4.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die qPCR wurde zur Untersuchung der Genexpression pro-inflammatorischer Mediatoren verwendet und ermöglichte im Folgenden einen Vergleich der Expressionsunterschiede zwischen den Kontrollansätzen und Stimulationsansätzen bezogen auf ein unreguliertes *housekeeping*-Gen. Hierfür wurde das TaqMan®-System eingesetzt, welches neben den spezifischen Primern der zu analysierenden Gentranskripte spezielle TaqMan®-Sonden (Oligonukleotide) enthält. Diese verfügen am 5'-Ende über einen Reporter und am 3'-Ende über einen Quencher. Durch die räumliche Nähe des Reporters zum Quencher wird unter Anregung kein Fluoreszenzsignal emittiert. Durch die 5'-3'-Exonucleaseaktivität der *Thermophilus aquaticus* Polymerase (Taq) werden bei der Polymerisation der neuen -Stränge der Reporter und der Quencher von den Oligonukleotiden gelöst. Durch diese räumliche Trennung wird unter Anregung ein messbares Fluoreszenzsignal erzeugt [114].

Es wurden die zu untersuchenden cDNA-Proben im Verhältnis 1:20 mit *Aqua bideest* verdünnt und jeweils 4 µl der verdünnten Proben in 3fach- Ansätzen auf eine 96-PCR-Mikrotiterplatte pipettiert. Hinzu wurden jeweils 16 µl des folgenden Reaktionsansatzes pipettiert:

Reaktionsansatz: 10 µl TaqMan® -Universal-Master Mix
1 µl TaqMan®-Assay on Demand (Primer+Sonden)
5 µl RNase-freies *Aqua bideest*

Die 96-Well-Platte wurde anschließend mit einer selbstklebenden Folie verschlossen und zur Analyse in das 7500 Fast Real-Time PCR System Applied Biosystems® gegeben. Die Untersuchung umfasste 40 PCR-Zyklen. Jeder Zyklus bestand aus drei Phasen. In der ersten Phase wurden die Proben auf 94 °C für 15 s erhitzt und dadurch denaturiert. Es folgte die Annealing-Phase, in der sich die spezifischen Primer an der cDNA hybridisierten, hierfür wurde die Temperatur für 60 s auf 60 °C gesenkt. In der letzten Phase, der Extensions-Phase, vervielfältigte die Taq-Polymerase bei 72 °C die gewünschten cDNA-Einzelstränge. Dem letzten Zyklus folgte eine 45 s lange Elongationsphase.

Die relative Quantifizierung erfolgt mithilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Hierbei wird der CT-Wert einer Probe mit dem CT-Wert des internen Standards 18s-rRNA (*housekeeping gene*) verglichen (ΔCT) und anschließend auf den CT-Wert des zu untersuchenden Gens bezogen. Die Auswertung der gemessenen Werte erfolgte mit der 7500 Software v2.0.6.

3.4.4 Western-Blot-Analyse

Der Western-Blot dient dem spezifischen Proteinnachweis mittels Antikörpern. Dafür werden zunächst Proteine ihrer Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt und auf eine Trägermembran übertragen. Im Anschluss erfolgt eine Immundetektion des zu untersuchenden Proteins. Die Immunreaktion wird mittel Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

3.4.4.1 Isolierung von Gesamtprotein für den Western-Blot

Für die Western-Blot Analyse wurde das Gesamtprotein untersucht. Hierfür wurde vor Ablösung der Zellen zunächst das Medium von den Stimulationsansätzen entfernt und die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden je 100 µl des frisch angesetzten Lysis-Puffers hinzugegeben. Die dadurch lysierten Zellen wurden mit Hilfe eines sterilen Zellschabers mechanisch vom Boden abgelöst. Das Zelllysate wurde sodann in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und anschließend wie folgt die Proteinmenge quantifiziert.

3.4.4.2 Bestimmung der Proteinmenge

Die Proteinmenge wurde mit einem BCA™Kit quantifiziert.

Zuerst wurden je 10 µl des Gesamtproteins je Probe in Doppelbestimmung in eine 96-Mikrotiterplatte pipettiert. Ebenfalls wurden Standardlösungen mit bekanntem Proteingehalt auf die Platte pipettiert. Sodann wurde das BCA™Arbeitsreagenz gemäß Herstellerangaben angesetzt. Hiervon wurden dann jeweils 200 µl zu jeder Gesamtproteinprobe sowie zu den Standards pipettiert. Nach einer Inkubation von 20 min bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Absorption im GENios-basic Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm. Anhand der Extinktion der Standardlösung wurde der Proteingehalt der Proben quantifiziert.

3.4.4.3 SDS-Page

Die zu untersuchenden Proteine wurden in einem SDS-Gel der Größe nach getrennt. Die Trenn- und Sammelgele wurden jeweils am Tag der Versuchsdurchführung hergestellt. Hierfür wurde zwischen zwei in eine Halterung gespannten parallel zueinanderstehenden Glasplatten das Trenngel (10%) gegossen und anschließend mit Propanol bedeckt. Nach dem Erreichen der gewünschten Festigkeit wurde die Propanol-Schicht abgesaugt und das frisch angesetzte Sammelgel (4,5%) auf das ausgehärtete Trenngel gegossen. Abschließend wurde ein spezieller Taschenkamm für die Erzeugung der späteren Probenaschen ins Sammelgel gesteckt. Nach Aushärten des Sammelgels wurde der Taschenkamm entfernt, das Gel aus der Halterung entnommen und in die mit Laufpuffer gefüllte Laufkammer überführt.

Für die SDS-Page wurden je 5 µg Protein der Proben mit SDS-Probenpuffer auf 20 µl aufgefüllt und die Probenansätze für 5 min auf 99 °C erhitzt und dabei denaturiert. Danach wurde in jede Probenasche jeweils 20 µl der Probenansätze geladen. Für die anschließende Bestimmung der Proteingröße wurden 6 µl eines Proteinmarkers in die erste Probenasche pipettiert. Nach dem Verschließen der Kammer wurde das Laufprogramm mit einer Spannung von 200 V und einer Stromstärke von 340 mA über circa 45 min gestartet. Um den Fortschritt des Laufes zu überwachen, wurden 10 µl einer gesättigten Bromphenolblau-Lösung in den Laufpuffer gegeben. Diese machte eine Lauflinie sichtbar.

3.4.4.4 Blotting

Nach Abschluss der SDS-Page wurden die aufgetrennten Proteine von dem Gel auf eine PVDF-Membran geblottet. Dafür wurde zunächst die PVDF-Membran für 1 min in Methanol aktiviert und anschließend mindestens 15 min in Transferpuffer gelagert. Die PVDF-Membran wurde auf zwei in Transferpuffer eingeweichte Whatman-Pappen auf die Kathodenplatte gelegt. Danach wurde das Gel von der Glasplatte gelöst und auf die PVDF-Membran überführt. Abschließend wurde das Gel mit zwei weiteren eingeweichten Whatman-Pappen bedeckt, durch Verstreichen von Luftblasen befreit, die mit Transferpuffer angefeuchtete Anodenplatte aufgelegt und das Blotting im Trans-Blot Turbo gestartet (2 Gele, 25 V, 340 mA, 30 min).

Durch diesen Schritt wurden die Proteine und der Protein-Marker von dem Gel auf die Membran übertragen. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde in 5% Kasein in TBS-T geblockt. Das Kasein belegt die freien Bindungsstellen der Membran, sodass keine unspezifischen Antikörperbindungen entstehen können. Danach wurde auf die Membran 1 ml Primärantikörperlösung (anti-pERK1/2 (1:1.000 in TBS-T)) pipettiert. Die Membran mitsamt der Antikörperlösung wurde anschließend in Klarsichtfolie eingeschweißt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Um überschüssige Antikörper von der Membran zu entfernen, wurde im Anschluss die Membran in eine Glasküvette überführt und in drei je fünfzehnminütigen Waschschritten unter Bewegung mit TBS-T gewaschen. Danach wurde die Membran in eine Schale gelegt und in 10 ml HRP (Meerrettichperoxidase)-konjugierter Sekundärantikörperlösung (Goat-anti-rabbit-IgG-HRP linked Antibody (1:20.000 in 2% Magermilch in TBS-T)) für 30 min unter Bewegung inkubiert. Hierauf folgten weitere drei fünfzehnminütige Waschschrritte in TBS-T unter Bewegung.

3.4.4.5 Immundetektion

Im Anschluss an das Blotten wurde die Membran für 5 min in einer Substratlösung, die Luminol enthielt, inkubiert. Diese Lösung wurde aus jeweils 150 µl der Solution A und Solution B des ECL- SuperSignal West Femto-Kits™ angesetzt und auf die Membranen pipettiert. Während einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur oxidiert die Meerrettichoxidase das Luminol und Chemilumineszenz wird freigesetzt. Anschließend wurde die Membran in Klarsichtfolie gelegt und die markierten Proteinbanden mit Hilfe des Chemilumineszenzdetektors Fusion SL Vilber Lourmat

sichtbar gemacht. Die Quantifizierung der detektierten Proteinbanden erfolgte mit der zum Detektor gehörenden Software „FusionCapt Advance“.

3.5 Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Der ELISA dient dem spezifischen immunologischen Proteinnachweis. Es wurde ein Sandwich-ELISA zur Quantifizierung der Freisetzung von TNF- α und IL-6 im Zellkulturüberstand verwendet.

Hierfür wurde eine 96-ELISA-Platte mit 100 μ l Capture-Antikörper (anti-TNF- α oder anti-IL-6 (1:250 in DPBS)) je Vertiefung über Nacht bei 4°C beschichtet. Am darauffolgenden Tag wurden durch fünfmalige Waschungen mit dem Waschpuffer nicht gebundene Antikörper entfernt. Anschließend wurden 200 μ l Assay Diluent (DPBS + 10% FKS) je Vertiefung hinzugegeben und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Hierauf folgte eine erneute fünfmalige Waschung über jeweils 15 s. Anschließend wurden je Vertiefung 100 μ l der zuvor mit Assay Diluent verdünnten, zu untersuchenden Zellkulturüberstände in Dreifachansätzen auf die beschichtete Platte pipettiert (Proben mit LPS 1:50, Proben ohne LPS 1:2). Gleichzeitig wurde eine Standard-Konzentrationsreihe in Doppelbestimmung ebenfalls auf die Platte pipettiert. Nach Verschließen der Mikrotiterplatte erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 120 min bei 37 °C (IL-6) beziehungsweise für 120 min (TNF- α). Nach der Inkubationszeit erfolgte eine erneute Waschung mit dem Waschpuffer. Anschließend wurde ein Biotin-konjugierter Detection-Antikörper im Verhältnis 1:250 in Assay-Diluent verdünnt und davon jeweils 100 μ l in die Vertiefungen der Platte pipettiert.

Nach dem Verschluss der Platte erfolgte eine Inkubation von 60 min bei 37 °C. Nach einer erneuten Waschung wurden 100 μ l des Reporter-Reagenz (SAv-HRP) in einem Verdünnungsverhältnis von 1:250 in Assay-Diluent hinzugefügt. Der Reporter ist eine an Streptavidin gebundene Meerrettichperoxidase. Das Streptavidin weist eine sehr starke Affinität zu Biotin auf, sodass die Reporter sich stark an die Biotin-Moleküle binden. So kommt es zu multiplen Reporter-Bindungen an die Antigene und dies bewirkt eine Signalamplifikation. Die Platte wurde erneut verschlossen und über 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss eines weiteren Waschgangs wurden je 100 μ l der Substrat-Solution (TMB) pipettiert. Die Platte wurde

unverschlossen für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Bei der Indikatorreaktion wird Tetramethylbenzidin (TMB) in einer Meerrettichperoxidase-katalysierten Reaktion zu einem blauen Farbstoff oxidiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 50 µl Stop-Solution in Form von Schwefelsäure (H₂SO₄, 2N) beendet. Der Farbumschlag auf Gelb wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 550 nm) im Photometer ELISA GENios-basic gemessen und mit der Auswertungssoftware Magellan v5.03 analysiert. Der Farbumschlag war proportional zu der Menge des gebundenen Zielproteins. Anhand der mitgeführten Standards wurde eine Standardkurven erstellt und hieraus wurde die Konzentration des Zielantigens berechnet.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter der Zuhilfenahme des Programms GraphPad Prism 5 für Windows. Zur Ermittlung von Ausreißern in der Stichprobe wurde der Ausreißertest nach Grubbs verwendet. Die Varianzanalyse wurde mit dem ANOVA Test und dem Student-t-Test durchgeführt. Es wurde ein 5%-Signifikanzniveau ($p=0,05$) festgelegt.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss HS auf primäre Mikroglia der Ratten ausübt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind nachfolgend dargestellt.

4.1 Einfluss von Harnsäure auf das Überleben von Mikroglia

Zum Ausschluss einer zytotoxischen Wirkung von HS auf Mikroglia wurde der Einfluss von HS auf das Überleben der Mikroglia mittels MTT-Tests für die HS-Konzentrationen von 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M sowie in Kombination mit LPS ermittelt und auf die unstimulierte Kontrolle (100%) bezogen.

Bei den untersuchten HS-Konzentrationen in Ab- oder Anwesenheit von 5 ng/ml LPS zeigte sich nach 24 h Inkubationszeit kein zytotoxischer Effekt auf Mikroglia im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Ebenfalls zeigten 5 μ g LPS keine Zytotoxizität auf Mikroglia. Die Ergebnisse sind als prozentuale Relativwerte der Kontrolle mit Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben und in Abbildung 4 graphisch dargestellt. Die alleinige Inkubation mit 5 ng/ml LPS zeigte ein prozentuales Überleben von 91,1 (\pm 14,1)%, im Weiteren sind jeweils der Stimulationsansatz und das zugehörige prozentuale Überleben angegeben: HS [0,1 μ M]: 93,8 (\pm 4,2)%, HS [0,1 μ M] + LPS [5 ng/ml]: 98,1 (\pm 9,5)%, HS [1 μ M] 90,9 (\pm 6,7) %, HS [1 μ M] + LPS [5 ng/ml]: 97,1 (\pm 8,7) %, HS [10 μ M]: 93,9 (\pm 11,1) %, HS [10 μ M] + LPS [5 ng/ml]: 97,6 (\pm 11,2) %, HS: [100 μ M] 86,8 (\pm 10,1) % und HS [100 μ M] + LPS [5 ng/ml]: 104,6 (\pm 11,5) % (**Abb. 4**).

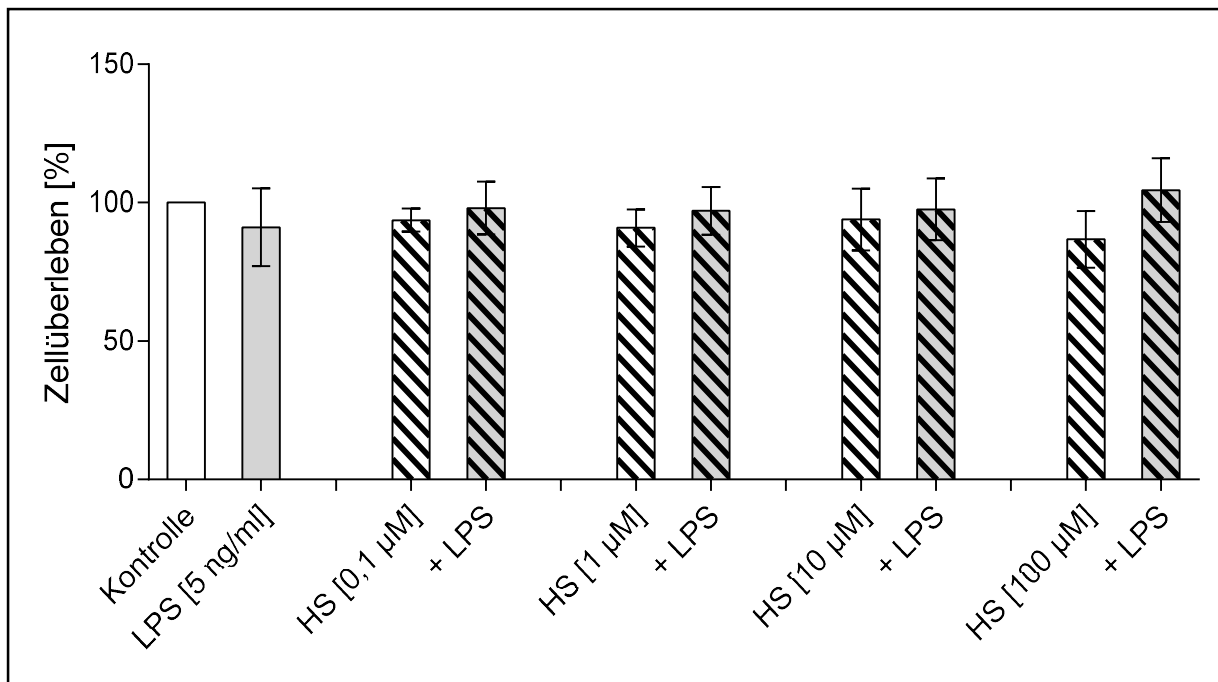


Abb. 4: Harnsäure ist nicht zytotoxisch für Mikroglia. Nach einer Inkubation von 24 h zeigten sich im MTT-Test für die HS-Konzentrationen [0,1 µM, 1 µM, 10 µM und 100 µM], LPS [5 ng/ml] sowie LPS [5 ng/ml] in Kombination mit jeweils HS der Konzentrationen [0,1 µM, 1 µM, 10 µM und 100 µM] keine Zytotoxizität auf Mikroglia. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert in % der Kontrolle \pm SEM (n=3).

HS hatte in den untersuchten Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf das Zellüberleben der Mikroglia. Sämtliche anschließende Untersuchungen wurden mit einer Harnsäurekonzentration von 10 µM durchgeführt.

4.2 Einfluss von Harnsäure auf das Proliferationsverhalten von Mikroglia

Das Proliferationsverhalten von Mikroglia unter HS-Einfluss wurde mittels Kristallviolett, einem DNA-interkallierenden Farbstoff, nach einer 24-stündigen Behandlungszeit untersucht. Die hieraus resultierenden Ergebnisse sind als Relativwerte der Kontrolle (100%) in Abbildung 5 dargestellt.

Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (100%) proliferierten die mit 10 µM HS behandelten Mikroglia geringer (81,7 (\pm 7,2)%). Mit LPS behandelte Mikroglia zeigten hingegen eine signifikant höhere Proliferation (124,2 (\pm 3,3)%). Die simultane Behandlung mit HS und LPS bewirkte im Vergleich zu den allein mit LPS aktivierten Mikroglia eine signifikante Reduktion der Proliferation auf nahezu den Kontrollwert (94,7 (\pm 2,0)%).

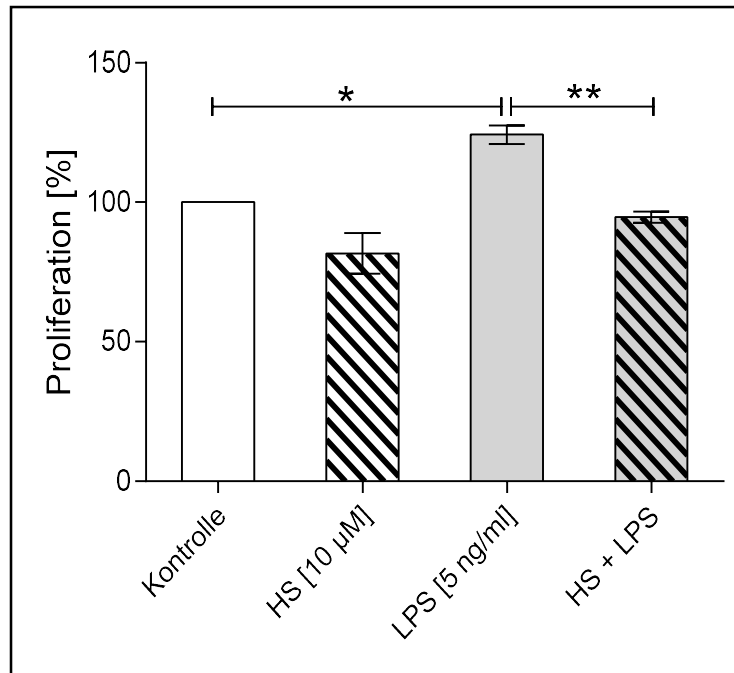


Abb. 5: Harnsäure hemmt die Proliferation von LPS-aktivierten Mikroglia. Nach 24 h zeigte sich im Proliferationstest mit Kristallviolett für die mit LPS behandelte Probe eine signifikante Zunahme der Proliferation, wohingegen HS alleine zu einer Senkung der Proliferationsrate führte. Die simultane Stimulation von LPS und HS bewirkte in Bezug auf die Kontrolle eine geringe Senkung, jedoch in Bezug auf die mit LPS behandelte Probe eine signifikante Reduktion. Dargestellt sind die Mittelwerte in % der Kontrolle \pm SEM (n=3; ** p < 0,01, * p < 0,05).

LPS bewirkte eine signifikante Proliferationssteigerung von Mikroglia. Durch die Zugabe von HS war der proliferative Effekt von LPS auf die Mikroglia signifikant reduziert.

4.3 Einfluss von Harnsäure auf den Aktivierungszustand von Mikroglia

Ein Anstieg von NO im Zellkulturüberstand gilt als Indikator einer Aktivierung von Mikroglia. NO wird in aktivierten Mikroglia durch die iNOS gebildet und daher kann über die iNOS mRNA-Expression indirekt auf den Aktivierungsstand der Mikroglia Rückschlüsse gezogen werden.

4.3.1 Einfluss von Harnsäure auf die iNOS mRNA-Expression in Mikroglia

Die iNOS mRNA-Expressionsrate wurde durch qPCR ermittelt. Die Ergebnisse sind als Relativwerte der LPS-aktivierten Mikroglia (100%) in Abbildung 6 dargestellt.

In den unbehandelten (Kontrolle) und den singularär mit HS behandelten Mikroglia wurde nach einer Behandlungsdauer von 6 h und von 24 h eine signifikant geringere, kaum messbare Expression der iNOS mRNA (Kontrolle: 6 h $0,0(\pm 0,0)\%$, 24 h $0,0(\pm 0,0)\%$; HS: 6 h $0,7(\pm 0,4)\%$, 24 h $0,1(\pm 0,0)\%$) detektiert. Die simultane Behandlung mit HS und LPS zeigte eine signifikante Reduktion: nach 6 h auf $68,2(\pm 9,6)\%$ und nach 24 h auf $68,7(\pm 6,3)\%$.

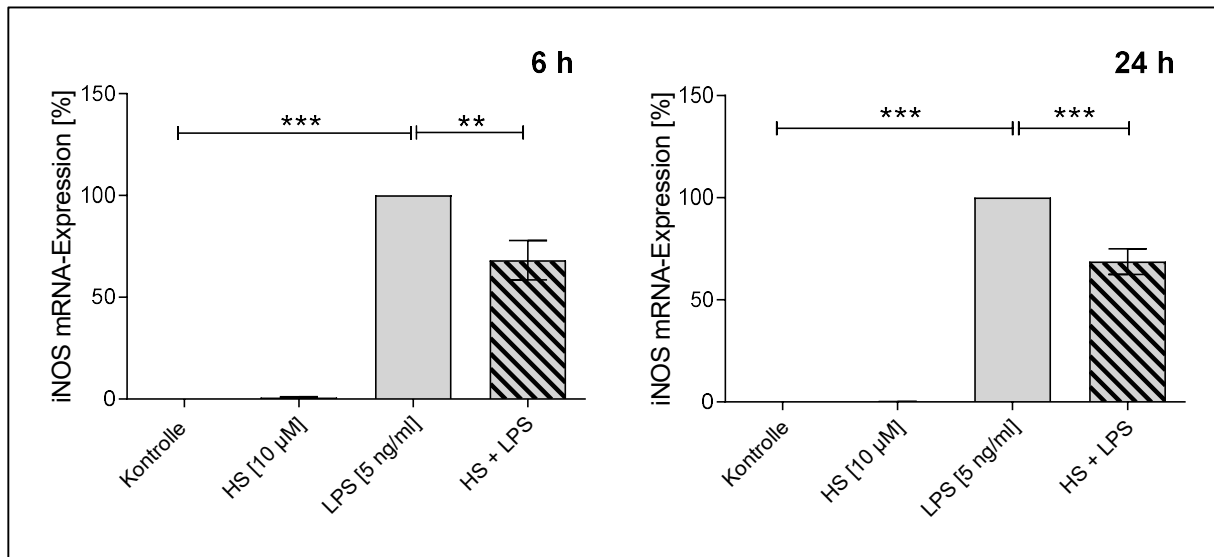


Abb. 6: Harnsäure reduziert die mRNA-Expression von iNOS in LPS-aktivierten Mikroglia nach 6 h und 24 h. Nach 6 h und nach 24 h zeigten sich in der Kontrolle sowie bei singularer Behandlung mit HS eine signifikant niedrigere iNOS mRNA-Expression. Die simultane Inkubation von LPS und HS bewirkte in Bezug auf die LPS-Probe eine signifikant geringere iNOS mRNA-Expression. Dargestellt sind die Mittelwerte in % der LPS-Ansätze \pm SEM (n=5 (6 h-Versuch), n=4 (24h-Versuch); *** p < 0,001, ** p < 0,01, * p < 0,05).

LPS erhöhte signifikant die mRNA-Expression von iNOS. Die Zugabe von HS zu mit LPS-aktivierten Mikroglia senkte signifikant die LPS-vermittelte iNOS mRNA-Expression.

4.3.2 Einfluss von Harnsäure auf die NO-Freisetzung von Mikroglia

Die NO-Freisetzung aktivierter Mikroglia wurde indirekt mittels Griess-Reagenzes im Kulturüberstand ermittelt. Die Ergebnisse der Stimulationen sind als Relativwert von LPS-aktivierten Mikroglia (100%) in Abbildung 7 dargestellt.

Die Kontrolle sowie die singularäre Behandlung mit HS zeigte nach 24 h im Verhältnis zur mit LPS behandelten Probe signifikant geringere NO-Konzentrationen im Überstand (Kontrolle: $4,9(\pm 0,7)\%$; HS $4,9(\pm 1,5)\%$). Die simultane Behandlung von

Mikroglia mit HS und LPS zeigt eine signifikante Reduktion der NO-Freisetzung auf 73,1(± 9,1)%.

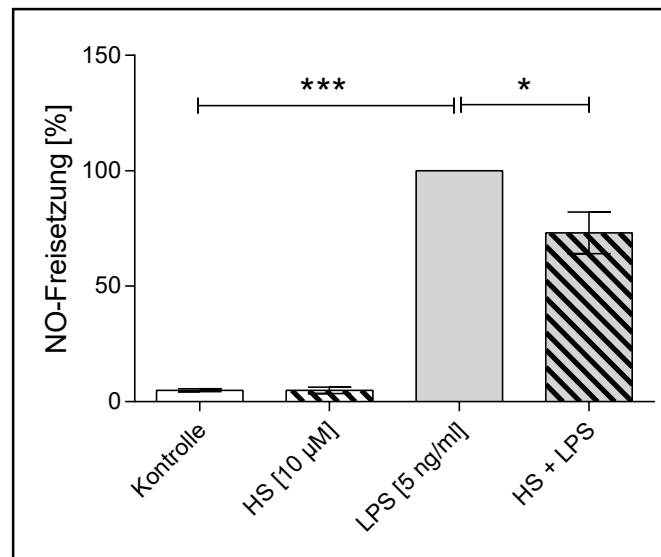


Abb. 7: Harnsäure senkt die NO-Freisetzung aus LPS-aktivierten Mikroglia. Nach 24 h zeigte sich in der Kontrolle sowie in den nur mit HS behandelten Proben eine signifikant niedrigere NO-Freisetzung. Die simultane Behandlung von LPS und HS bewirkte in Bezug auf die LPS-Probe eine signifikant geringere NO-Freisetzung. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert in % der LPS-Ansätze ± SEM (n=3; *** p < 0,001, * p < 0,05).

Durch LPS wurde die Freisetzung von NO-Molekülen signifikant erhöht. Die Zugabe von HS zu mit LPS-aktivierten Mikroglia senkte signifikant die LPS-vermittelte NO-Freisetzung.

4.4 Einfluss von Harnsäure auf proinflammatorische Zytokine in Mikroglia

Mikroglia besitzen ein reiches Arsenal an proinflammatorischen Mediatoren. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen über den Einfluss von HS auf ihre Synthese und Freisetzung an ausgewählten Beispielen wiedergegeben.

4.4.1 Einfluss auf TNF-α-Freisetzung aus Mikroglia

Einfluss von Harnsäure auf die TNF-α -mRNA-Expression

Die TNF-α-mRNA-Expressionsrate in Mikroglia wurde mittels qPCR ermittelt. Die Ergebnisse sind als Relativwerte der mit LPS-aktivierten Mikroglia (100%) in Abbildung 8 dargestellt.

Die Kontrolle und die singularär mit HS behandelten Mikroglia wiesen nach 6 h und nach 24 h in Bezug auf die LPS-aktivierten Mikroglia eine signifikant niedrigere TNF- α -Expression auf (Kontrolle: 6 h 1,0(\pm 0,4)%, 24 h 19,5(\pm 4,5)%; HS: 6 h 2,0(\pm 0,6)%, 24 h 26,0(\pm 1,9)%). Die zusätzliche Behandlung von LPS-aktivierten Mikroglia mit HS bewirkte eine signifikante Reduktion der TNF- α -Expression nach 6 h auf 59,6(\pm 6,1)% und nach 24 h auf 63,6(\pm 9,3)%.

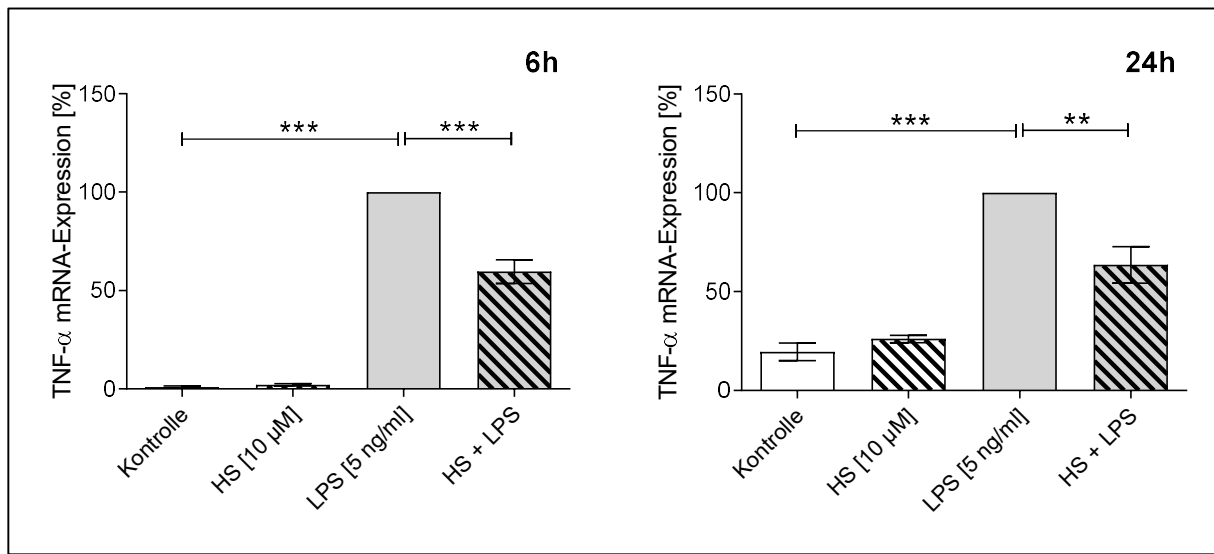


Abb. 8: Harnsäure senkt die mRNA-Expression von TNF- α in LPS-aktivierten Mikroglia nach 6 h und nach 24 h. Nach 6 h und nach 24 h zeigten sich in der Kontrolle und in der singularär mit HS behandelten Mikroglia eine signifikant geringere TNF- α -mRNA-Expression. Die simultane Inkubation von HS und LPS bewirkte in Bezug auf die LPS-Probe eine signifikant geringere TNF- α -mRNA-Expression nach 6 h und nach 24 h. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert in % der LPS-Ansätze \pm SEM (n=5 (6 h), n=3 (24 h); *** p < 0,001, ** p < 0,01, * p < 0,05).

LPS erhöhte signifikant die TNF- α -mRNA-Expression in Mikroglia. Durch die Koinkubation mit HS konnte die LPS-vermittelte TNF- α -mRNA-Expression signifikant gesenkt werden.

Einfluss von Harnsäure auf die TNF- α -Freisetzung

Die TNF- α -Freisetzung der Mikroglia wurde mithilfe eines ELISA quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 als Relativwerte der TNF- α -Freisetzung LPS-aktivierter Mikroglia (100%) dargestellt.

Die unstimulierte Kontrolle und die singularär mit HS behandelten Mikroglia wiesen nach 6 h eine signifikant geringere, kaum messbare TNF- α -Freisetzung auf (Kontrolle: 6 h 0,0(\pm 0,0), 24 h 0,0(\pm 0,0)%; HS: 6 h 0,1(\pm 0,1)%, 24 h 0,0(\pm 0,0)%). Die simultane Behandlung von LPS-aktivierten Mikroglia mit HS bewirkte eine deutliche Reduktion der TNF- α -Freisetzung nach 6 h auf 66,7(\pm 30,1)% und nach 24 h auf 87,5(\pm 10,0)%.

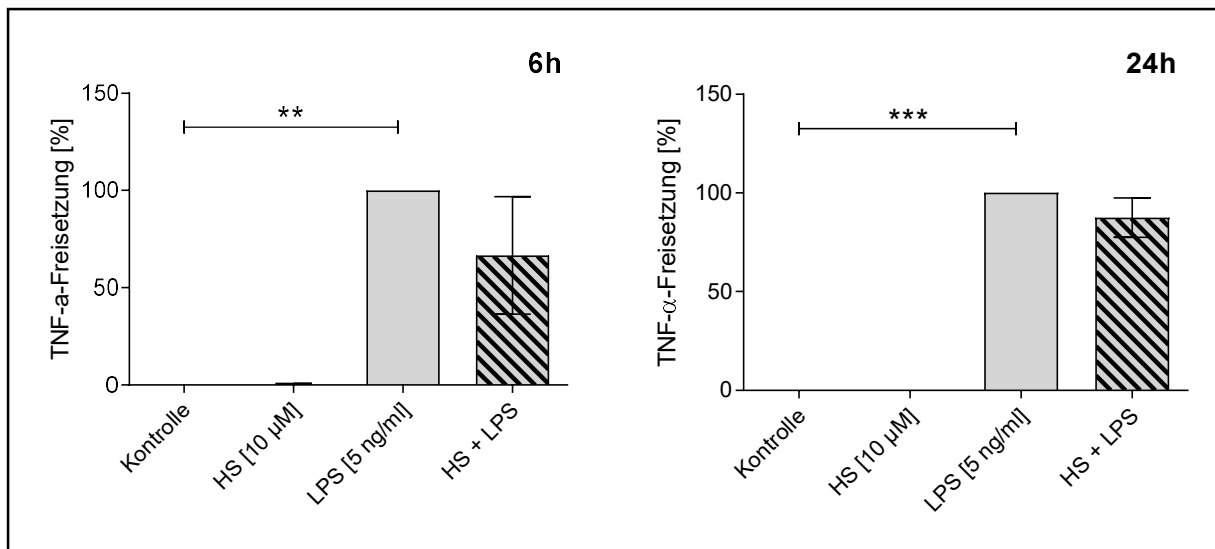


Abb. 9: Harnsäure reduziert die TNF- α -Freisetzung aus LPS-aktivierten Mikroglia nach 6 h und 24 h. Nach 6 h und 24 h zeigten sich in der Kontrolle und in den singularär mit HS behandelten Mikroglia eine signifikant geringere TNF- α -Freisetzung. Die simultane Inkubation von HS und LPS bewirkte in Bezug auf die LPS-Probe eine geringere TNF- α -Freisetzung nach 6 h und nach 24 h. Dargestellt ist jeweils der Mittelwerte in % der LPS-aktivierten Mikroglia \pm SEM (n=3 (6 h-Versuch), n=3 (24 h-Versuch); *** p < 0,001, ** p < 0,01).

Die Zugabe von LPS bewirkt eine signifikante erhöhte Freisetzung von TNF- α . Die Kombination mit HS senkt die Freisetzung von TNF- α .

4.4.2 Einfluss von Harnsäure auf die IL-6-Freisetzung in Mikroglia

Einfluss von Harnsäure auf die IL-6 mRNA-Expression

Die mRNA-Expression von IL-6 wurde mittels qPCR untersucht. In der Abbildung 10 ist die IL-6 mRNA-Expression als Relativwerte der LPS-aktivierten Mikroglia (100%) dargestellt.

Die unstimulierte Mikroglia und die singularär mit HS behandelten Mikroglia wiesen eine signifikant geringere IL-6 mRNA-Expression als die mit LPS-aktivierten Mikroglia auf (Kontrolle: 6 h 0,5(\pm 0,5)%, 24(\pm 0,1)%; HS: 6 h 2,0(\pm 0,9)%, 24(\pm 1,7)%). Durch die zusätzliche Behandlung von LPS-aktivierten Mikroglia mit HS zeigte sich eine signifikante Reduktionen der IL-6 mRNA-Expression nach 6 h auf 85,2(\pm 27,8)% und nach 24 h auf (69,8(\pm 8,2)%).

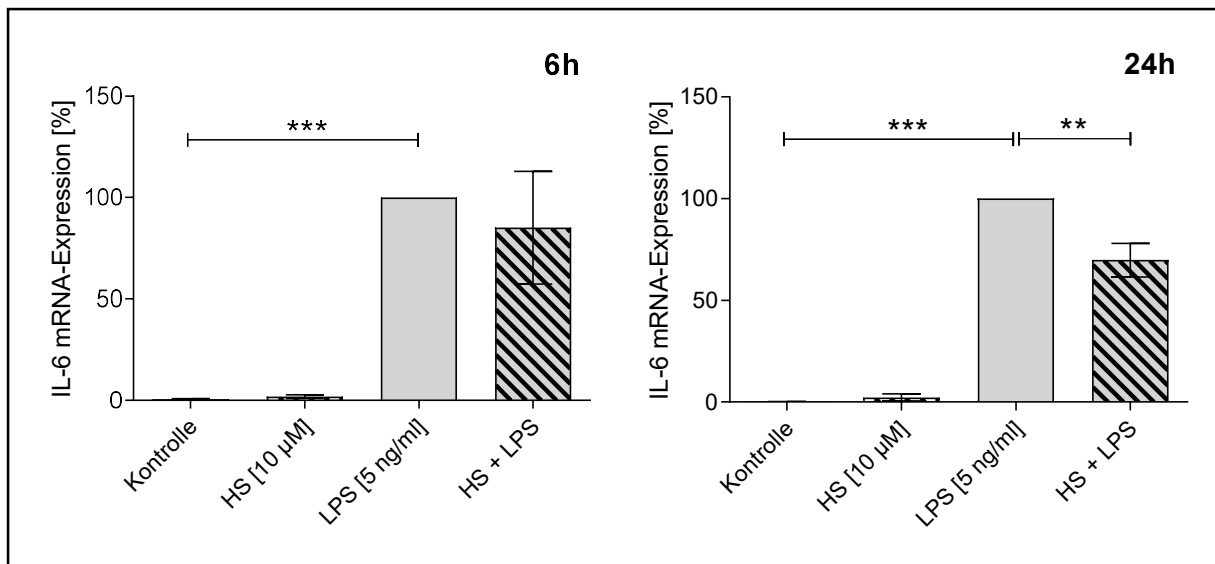


Abb. 10: Harnsäure reduziert die IL-6 mRNA-Expression in LPS-aktivierten Mikroglia nach 6 h und 24 h. Nach 6 h und 24 h zeigten die unstimulierte Kontrolle und die nur mit HS behandelten Mikroglia eine signifikant geringere IL-6 mRNA-Expression. Durch die zusätzliche Behandlung von LPS-aktivierten Mikroglia mit HS wurde die IL-6 mRNA-Expression nach 6 h reduziert und nach 24 h signifikant reduziert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwerte in % der mit LPS aktivierten Mikroglia \pm SEM (n=5 (6 h-Versuch), n=4 (24 h-Versuch); *** p < 0,001, ** p < 0,01).

LPS erhöhte signifikant die IL-6 mRNA-Expression. Die Zugabe von HS reduzierte nach 24 h die mRNA-Expression von IL-6 signifikant.

Einfluss von Harnsäure auf die IL-6-Freisetzung

Die IL-6-Freisetzung wurde mittels ELISA untersucht. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse als Relativwerte der LPS-aktivierten Mikroglia (100%) abgebildet.

Die unstimulierte Kontrolle und die singuläre mit HS behandelten Mikroglia wiesen nach 6 h und nach 24 h eine signifikant geringere, nicht messbare IL-6-Freisetzung auf (Kontrolle: 6 h 0,0(\pm 0,0)%, 24 h 0,0(\pm 0,0)%; HS: 6 h 0,0(\pm 0,0)%, 24 h 0,0(\pm 0,0)%). Die simultane Behandlung von LPS-aktivierten Mikroglia mit HS bewirkte eine nach 6 h signifikante Reduktion auf 55,8(\pm 19,6)% und nach 24 h eine Reduktion auf 71,0(\pm 18,5)%.

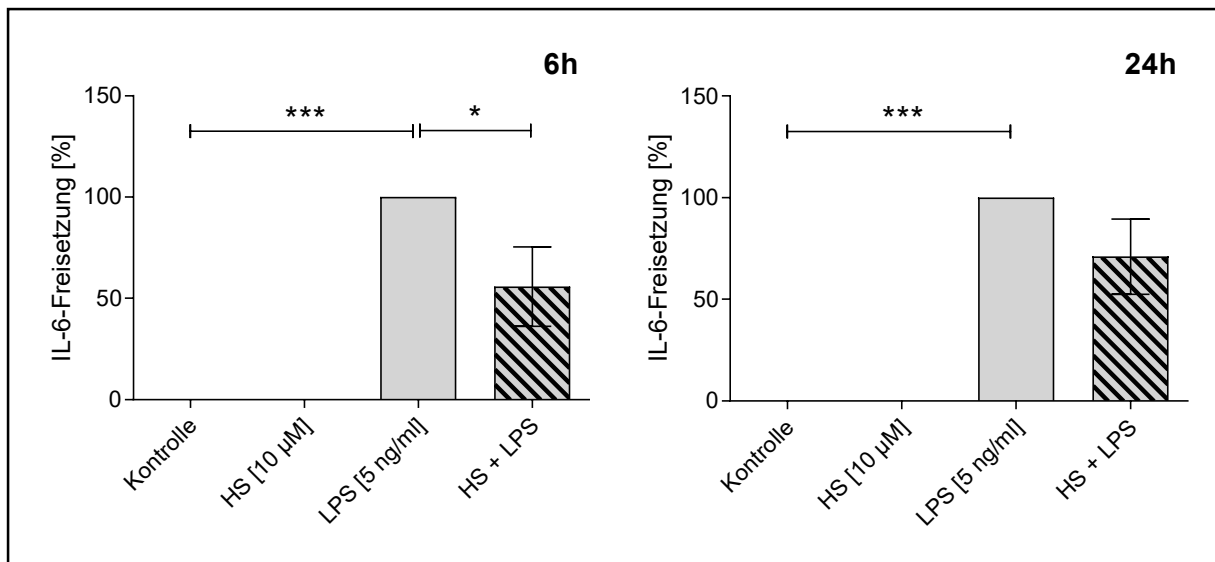


Abb. 11: Harnsäure senkt die IL-6-Freisetzung aus LPS-aktivierten Mikroglia nach 6 h und 24 h. Nach 6 h und nach 24 h zeigten sich in der Kontrolle und in der singular mit HS behandelten Mikroglia eine signifikant geringere IL-6-Freisetzung in Bezug auf die LPS-aktivierten Mikroglia. Die simultane Inkubation von HS und LPS bewirkte in Bezug auf die LPS-Probe nach 6 h eine signifikante geringere und nach 24 h deutlich geringere IL-6-Freisetzung. Dargestellt ist jeweils der Mittelwerte in % der LPS-aktivierten Mikroglia \pm SEM (n=4 (6 h-Versuch), n=3 (24 h-Versuch); *** p < 0,001, * p < 0,05).

Mit LPS aktivierte Mikroglia setzten signifikant mehr IL-6 frei. Die kombinierte Inkubation von HS und LPS reduzierte nach 6 h die IL-6-Freisetzung signifikant.

4.4.3 Einfluss von Harnsäure auf die IL-1 β mRNA-Expression

Die mRNA-Expression von IL-1 β wurde mittels qPCR gemessen. Die Ergebnisse sind als Relativwert der LPS-aktivierten Mikroglia (100%) in Abbildung 12 dargestellt.

Die unstimulierten Mikroglia und die singular mit HS behandelten Mikroglia wiesen eine signifikant geringere IL-1 β mRNA-Expression als die mit LPS aktivierten Mikroglia auf (Kontrolle: 6 h 0,4(\pm 0,1)%, 24 h 1,5(\pm 0,5)%; HS: 6 h 1,3(\pm 0,5)%, 24 h 4,0(\pm 1,5)%). Durch die zusätzliche Behandlung von LPS-aktivierten Mikroglia mit HS zeigte sich eine signifikante Reduktion der IL-1 β mRNA-Expression nach 6 h auf 70,8(\pm 11,0)% und nach 24 h auf 67,5(\pm 4,5)%.

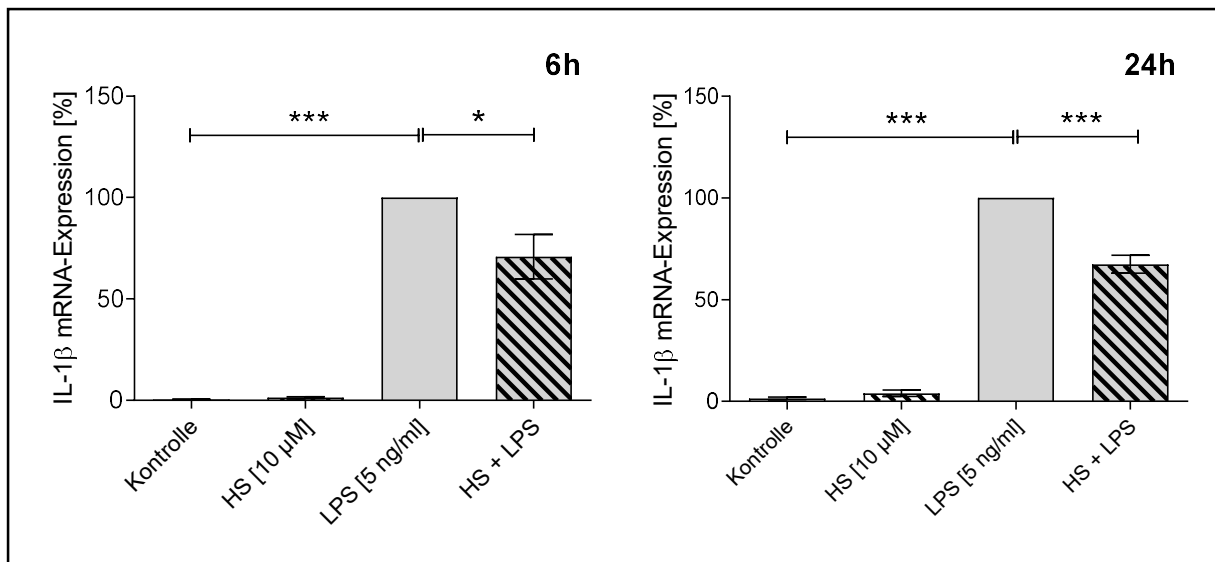


Abb. 12: Harnsäure reduziert die IL-1 β mRNA-Expression in LPS-aktivierten Mikroglia nach 6 h und 24 h. Nach 6 h und 24 h zeigten sich in der Kontrolle und in der singulär mit HS behandelten Mikroglia in Bezug auf die LPS Probe signifikant geringere IL-1 β mRNA-Expressionen. Die simultane Inkubation von HS und LPS bewirkt in Bezug auf die LPS-Probe signifikant geringere IL-1 β mRNA-Expressionen nach 6 h und nach 24 h. Dargestellt ist jeweils der Mittelwerte in % der LPS-aktivierten Mikroglia \pm SEM (n=5 (6 h-Versuch), n=4 (24 h-Versuch); *** p < 0,001, * p < 0,05).

Die Inkubation von Mikroglia mit LPS führte zu einer signifikant erhöhten mRNA-Expression von IL-1 β . Die Zugabe von HS zu LPS-aktivierte Mikroglia reduzierte die IL-1 β mRNA-Expression signifikant.

4.5 Einfluss von Harnsäure auf proinflammatorische Enzyme in Mikroglia

Mikroglia sind zur Synthese proinflammatorischen Enzyme fähig. Hierzu zählen neben der in Kapitel 4.3.1 erläuterten iNOS zudem COX2 und MMP-9. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen über den Einfluss von HS auf ihre Synthese wiedergegeben.

4.5.1 Einfluss von Harnsäure auf die COX-2 mRNA-Expression

Die mRNA-Expression von COX-2 wurde mittels qPCR untersucht. Die Ergebnisse sind als Relativwert von den mit LPS stimulierten Mikroglia (100%) in Abbildung 13 dargestellt.

Die Kontrolle sowie die singuläre Behandlung mit HS zeigten nach 6 h und nach 24 h signifikant geringere COX-2 mRNA-Expressionen als die mit LPS behandelten Proben (Kontrolle: 6 h 0,9(\pm 0,5)%, 24 h 0,7(\pm 0,2)% ; HS: 6 h 1,4(\pm 0,6)%, 24 h 3,0(\pm 2,0)%).

Die simultane Behandlung mit HS und LPS zeigte nach 6 h eine Reduktion auf $88,7(\pm 21,1)\%$ und nach 24 h eine signifikante Reduktion auf $58,3(\pm 6,3)\%$.

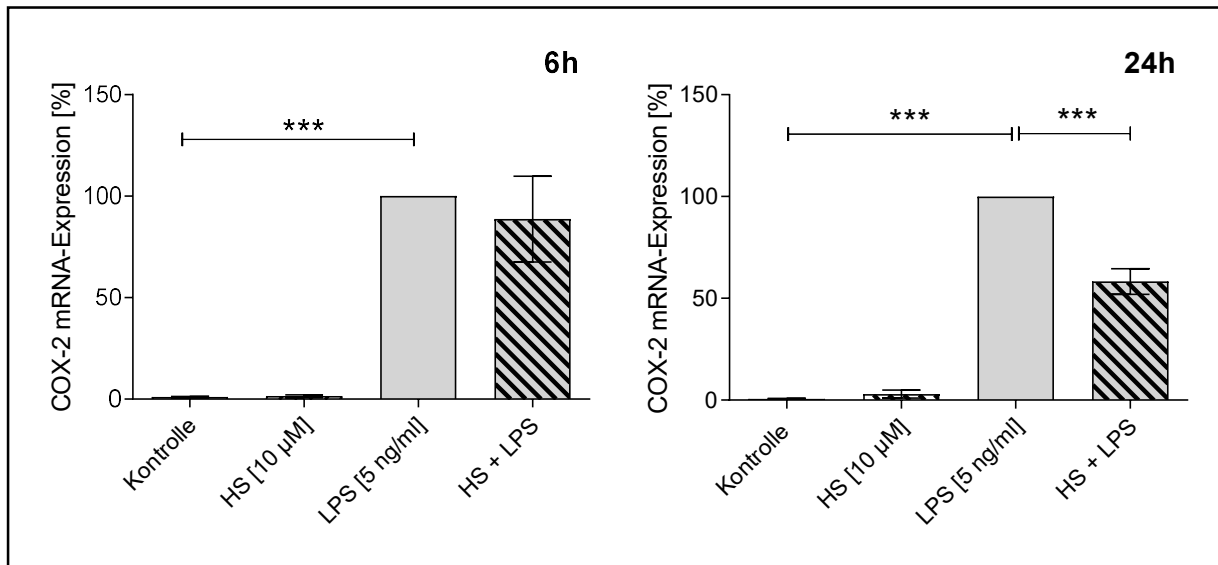


Abb. 13: Harnsäure reduziert die COX-2 mRNA-Expression in LPS-aktivierten Mikroglia nach 6 h und 24 h. Nach 6 h und nach 24 h zeigten sich in der Kontrolle sowie in den singular mit HS behandelten Mikroglia signifikant niedrigere COX-2 mRNA-Expressionen. Die simultane Inkubation von HS und LPS bewirkte in Bezug auf die LPS-Probe nach 6 h reduzierte und nach 24 h signifikant reduzierte COX-2 mRNA-Expressionen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwerte in % der LPS-aktivierten Mikroglia \pm SEM (n=5 (6 h-Versuch), n=4 (24 h-Versuch); *** p < 0,001).

Die Inkubation mit LPS steigert signifikant die mRNA-Expression von COX-2. Die Zugabe von HS konnte nach 24 h die LPS-vermittelte COX-2 mRNA-Expressionssteigerung signifikant reduzieren.

4.5.2 Einfluss auf die MMP-9 mRNA-Expression

Die MMP-9 mRNA-Expression wurde mittels qPCR untersucht. Die hieraus resultierenden Ergebnisse sind als Relativwert der LPS-aktivierten Mikroglia (100%) in Abbildung 14 dargestellt.

Die Kontrolle sowie die singuläre Behandlung mit HS zeigten nach 6 h und nach 24 h signifikant geringere MMP-9 mRNA-Expressionen als die mit LPS behandelten Mikroglia (Kontrolle: 6 h $5,7(\pm 2,6)\%$, 24 h $3,7(\pm 1,3)\%$; HS: 6 h $7,1(\pm 3,0)\%$, 24 h $6,1(\pm 1,2)\%$). Die simultane Inkubation von Mikroglia mit HS und LPS zeigten signifikante Reduktionen der MMP-9 mRNA-Expressionen nach 6 h auf $47,3(\pm 10,3)\%$ und nach 24 h auf $55,2(\pm 5,0)\%$.

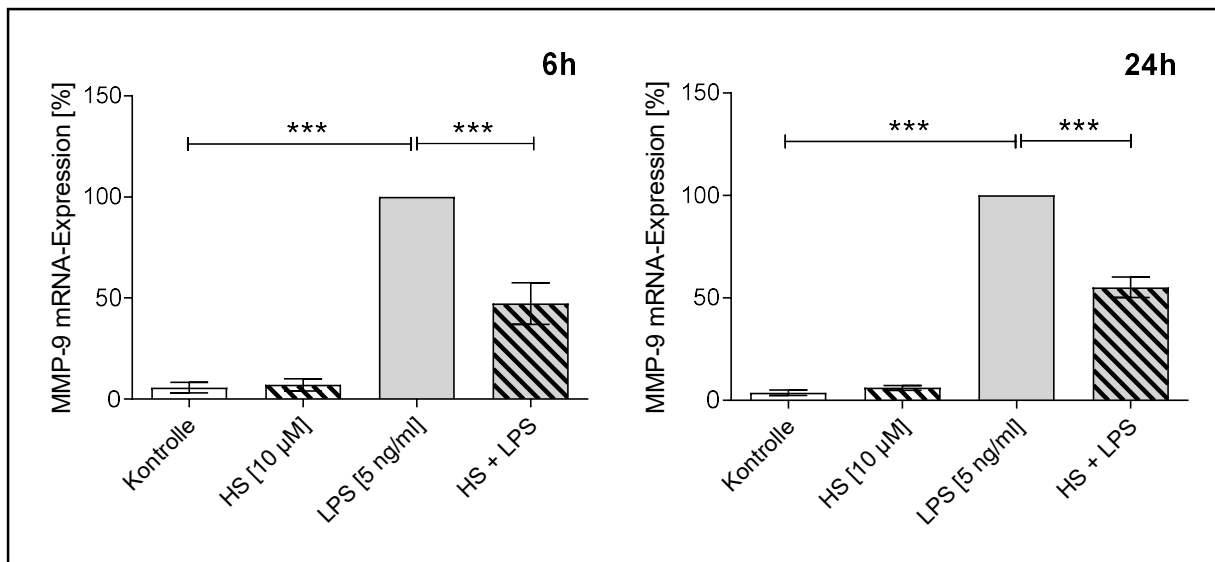


Abb. 14: Harnsäure reduziert die MMP-9 mRNA-Expression in LPS-aktivierten Mikroglia nach 6 h und 24 h. Nach 6 h und nach 24 h zeigten sich in der Kontrolle und in der singular mit HS-behandelten Mikroglia in Bezug auf die LPS-aktivierten Mikroglia signifikant niedrigere MMP-9 mRNA-Expressionen. Die simultane Inkubation von HS und LPS bewirkte in Bezug auf die LPS-Probe nach 6 h und nach 24 h signifikant reduzierte MMP-9 mRNA-Expressionen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwerte in % der LPS-aktivierten Mikroglia \pm SEM ($n=3$ (6 h-Versuch), $n=3$ (24 h-Versuch); *** $p < 0,001$).

Die Inkubation mit LPS steigerte signifikant die mRNA-Expression von MMP-9. Durch die Kombination von LPS mit HS war die MMP-9 mRNA-Expression signifikant reduziert.

4.5.3 Zusammenfassende Darstellung der mRNA-Untersuchungen

Die im Anschluss aufgeführten Tabellen geben einen vergleichenden Überblick über die Ergebnisse der mRNA-Expressionsexperimente.

Tab. 1: Zusammenfassung der qPCR-Ergebnisse der proinflammatorischen Zytokine (▼ = Senkung; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$)

Ansatz	TNF- α		IL-6		IL-1 β	
	6 h	24 h	6 h	24 h	6 h	24 h
LPS vs. HS + LPS	▼ ***	▼ **	▼	▼ **	▼ *	▼ ***

Tab. 2: Zusammenfassung der qPCR-Ergebnisse der proinflammatorischen Enzyme (▼ = Senkung; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,001$)**

Ansatz	iNOS		COX-2		MMP-9	
	6 h	24 h	6 h	24 h	6 h	24 h
LPS vs. HS + LPS	▼ **	▼ ***	▼	▼ ***	▼ ***	▼ ***

4.6 Einfluss von Harnsäure auf intrazelluläre Signalwege in Mikroglia

Die Aktivierung von Mikroglia auf äußere Reize erfolgt über intrazelluläre Signalkaskaden.

4.6.1 Einfluss von Harnsäure auf den MAP-Kinasen-Signalweg

Die Beeinflussung des ERK-Signalwegs wurde durch das vermehrte Auftreten von phosphoryliertem ERK1/2 (pERK1/2) untersucht. Hierfür wurden phosphoryliertes und unphosphoryliertes ERK mittels Western-Blot nachgewiesen und densitometrisch ausgewertet. Die Ergebnisse der Untersuchung sind als Relativwerte der LPS-aktivierten Mikroglia (100%) in Abbildung 15 dargestellt. In Abbildung 16 ist ein repräsentativer Western-Blot nach 45 min abgebildet. Die Kontrolle sowie die singuläre Behandlung mit HS zeigten nach 45 min eine signifikant geringere Phosphorylierung von ERK1/2 als die mit LPS behandelten Mikroglia (Kontrolle: $9,8(\pm 1,9)\%$; HS: $11,3(\pm 2,5)\%$). Die simultane Inkubation von Mikroglia mit HS und LPS zeigte eine signifikant reduzierte Phosphorylierung von ERK1/2 ($89,6(\pm 0,8)\%$).

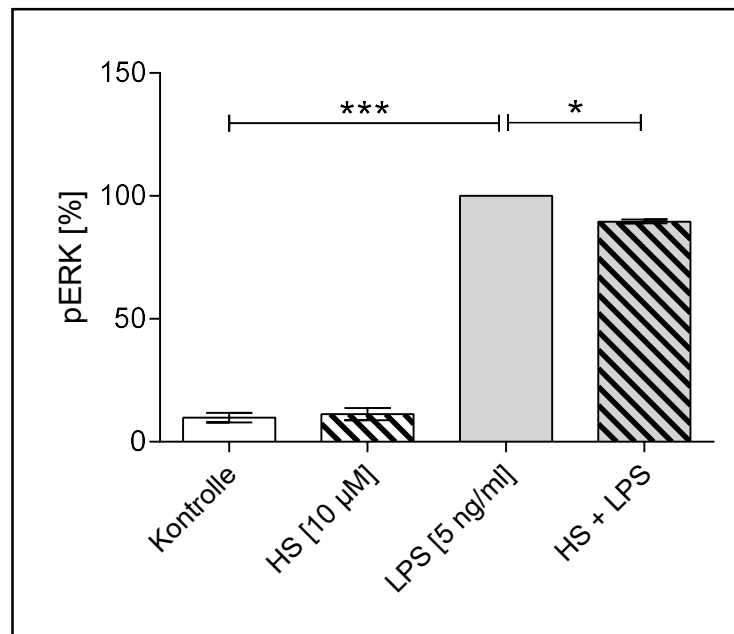


Abb. 15: Harnsäure senkt die Phosphorylierung von ERK1/2 in LPS-aktivierten Mikroglia nach 45 min. Nach 45 min zeigte sich in der Kontrolle und den singular mit HS-behandelten Mikroglia in Bezug auf die LPS-aktivierten Mikroglia signifikant niedrigere Phosphorylierungen von EKR1/2. Die simultane Inkubation von HS und LPS bewirkte in Bezug auf die LPS-Probe signifikant reduziertes Vorkommen von pERK1/2. Dargestellt ist jeweils der Mittelwerte in % der LPS-aktivierten Mikroglia \pm SEM (n=3; *** p < 0,001, * p < 0,05).

Die Inkubation mit LPS erhöhte signifikant die Phosphorylierung von ERK1/2. Durch die Zugabe von HS konnte die Phosphorylierung signifikant auf 89,6% reduziert werden.

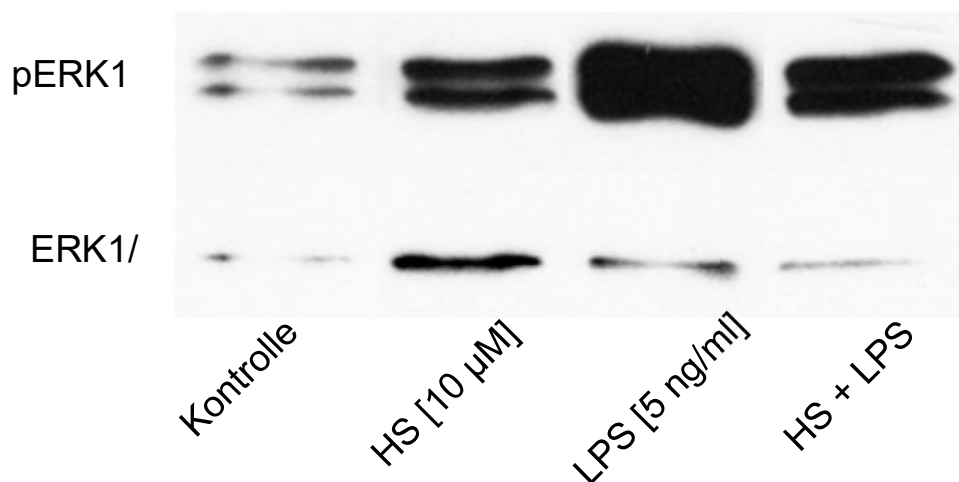


Abb. 16: Harnsäure senkt die Phosphorylierung von ERK1/2 in LPS-aktivierten Mikroglia nach 45 min. Abgebildet ist ein repräsentativer Western-Blot.

5 Diskussion

Im Anschluss werden die Ergebnisse im Kontext der aktuellen Forschung und im Hinblick eines therapeutischen Einsatzes von HS bei dem PD diskutiert.

5.1 Toxizität der Harnsäure

Zu Beginn wurden Experimente zur Untersuchung möglicher toxischer Effekte von HS auf Mikroglia durchgeführt. Hierbei zeigte sich *in vitro* keine zytotoxische Wirkung von HS auf Mikroglia in den Konzentrationen von 0,1 μM , 1 μM , 10 μM und 100 μM .

Andererseits zeigt sich bei höherem HS-Spiegel oberhalb seiner Löslichkeitsgrenze die Bildung von MSU-Kristallen. In der 2015 veröffentlichten Studie der Arbeitsgruppe um Hwang zeigte sich ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Auftreten von MSU-Kristallen und der Aktivierung von autophagischen Prozessen mit daraus resultierendem Zelluntergang. In ihren *in vitro*-Versuchen setzten sie humane Chondrozyten verschiedenen Konzentrationen von MSU-Kristallen aus. Die MSU-Kristalle steigerten die LC3- mRNA-Expression und aktivierten autophagische Prozesse durch die Suppression der Akt/mTOR-Signalachse. Dabei setzten sie aus übersättigten HS-Lösungen gewonnene MSU-Kristalle in einer Konzentration von 50 - 200 $\mu\text{g/ml}$ ein [115]. Dafür wurde bewusst das proentzündliche Agens der HS verwendet. Die MSU-Kristalle bilden sich bei einer Überschreitung des Löslichkeitsprodukts der HS. Unter Normalbedingungen liegt die Löslichkeitsgrenze von HS im Serum bei ca. 6,8 mg/dl [76]. Die in dieser Arbeit eingesetzte HS-Dosis von 10 μM entspricht 0,17 mg/dl und würde auch bei männlichen Patienten mit hochnormalen HS-Spiegeln nicht zu einer Überschreitung seines Löslichkeitsproduktes führen. Eine Änderung der Rahmenbedingungen, wie zum Beispiel eine reduzierte Umgebungstemperatur oder veränderter pH-Wert, könnte ebenfalls zu einer MSU-Kristallbildung führen. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde durch jeweils frisch angesetzte HS-Lösungen konsequent versucht, die Bildung von MSU-Kristallen zu verhindern, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden.

5.2 Einfluss von Harnsäure auf die Proliferation von Mikroglia

In den Untersuchungen zur Proliferation von Mikroglia zeigte sich, dass ihre Aktivierung mittels LPS zu ihrer Proliferation führte. Durch die gleichzeitige Inkubation mit HS blieb diese Proliferation aus. Die Aktivierung stellt in Mikroglia einen Proliferationsreiz dar [116]. Eine Reduzierung ihrer Proliferation und somit das verminderte Aufkommen von Mikroglia im ZNS ist gleichbedeutend mit einer verminderten Entzündungsantwort. Dieser Effekt kann im Falle einer neurodegenerativen Erkrankung therapeutisch genutzt werden.

In den *in vitro* Experimenten der Arbeitsgruppe um Eleftheriadis an humanen Lymphozyten zeigte sich ein gegensätzliches Ergebnis. Hier wurde der Einfluss von HS auf den Purinrezeptor P2X7 (P2X7) und die durch seine Aktivierung resultierende Proliferation untersucht. Dabei zeigte sich jedoch, dass die exogene Zugabe von HS zu einer Proliferation der Lymphozyten führte. In den *in vitro*-Versuchen wurden die HS-Konzentrationen von 10 mg/dl und 20 mg/dl eingesetzt. Dies entspricht dem Vielfachen der durchschnittlichen HS-Serumspiegel und der 59-fachen bzw. 117-fachen der in dieser Arbeit verwendeten HS-Konzentration [117]. Das Löslichkeitsprodukt der HS wird um ein Vielfaches überschritten und führte zu einer Bildung von MSU-Kristallen, welche für die Aktivierung von P2X7-Rezeptoren wahrscheinlich ursächlich waren. Dieses wird durch die Beobachtungen von Gicquel *et al.* bestätigt. In ihren *in vitro*-Versuchen wurde bei einer exogenen Zugabe von MSU-Kristallen die mRNA-Expression des P2X7-Rezeptors in humanen Makrophagen beobachtet. Es zeigte sich eine Induktion der P2X7-Rezeptor mRNA-Expression. Dies deutet auf den direkten Einfluss von MSU-Kristallen auf den P2X7-Rezeptor hin [118].

5.3 Einfluss von Harnsäure auf die Stickstoffmonoxidproduktion von Mikroglia

In dieser Arbeit zeigte sich durch die Zugabe von HS in LPS-aktivierten Mikroglia neben einer signifikant reduzierten NO-Freisetzung ebenfalls eine signifikant verminderte Expression der iNOS-mRNA. Oxidativer Stress und die Bildung von radikalen Sauerstoffspezies stehen in Verbindung mit den Pathologien von PD sowie weiterer neurodegenerativen Erkrankungen [119]. Durch eine Verminderung des oxidativen Stresses und verminderte Bildung von NO zeigten sich neuroprotektive Effekte.

Im 2008 veröffentlichten Zeitungsaufsatz von Gersch *et al.* wurde in chemischen Versuchen gezeigt, dass HS in der Lage ist, NO direkt abzufangen und mit ihm gemeinsam das stabile 6-Aminouracil bilden kann [95]. Über dieses Erkenntnis hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass neben ihren reinen antioxidativen Eigenschaften, die HS ebenfalls direkten Einfluss auf die Expression des NO-synthetisierenden Enzyms ausübt. Derzeit liegen keine verlässlichen Daten über den Einfluss von HS auf iNOS vor. Die Arbeitsgruppe um Park befasste sich mit diesem Zusammenhang zwischen HS und der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS). Hierfür analysierten sie den Einfluss von HS auf die eNOS-Aktivität und ihre mRNA-Expression in humanen umbilikalen Endothelzellen. Es zeigte sich eine verminderte NO-Produktion unter der Zugabe von HS, jedoch wurde hier keine Veränderung in der eNOS-mRNA-Expression festgestellt [120]. Hier muss beachtet werden, dass die eNOS-mRNA kontinuierlich exprimiert wird und keinem extrazellulären Expressionsreiz bedarf, hingegen wird die in dieser Arbeit untersuchte iNOS-mRNA-Expression durch Signalkaskaden gesteuert und im Rahmen von entzündlichen Geschehen vermehrt exprimiert. So könnte die in dieser Arbeit beobachtete reduzierte iNOS-mRNA-Expression in einer HS-vermittelten Beeinflussung proinflammatorischer Signalkaskaden oder Veränderung der iNOS-mRNA-Stabilität begründet liegen.

5.4 Einfluss von Harnsäure auf proinflammatorische Faktoren in Mikroglia

In den Untersuchungen über den Einfluss von HS auf proinflammatorische Faktoren (TNF α , IL-1 β , IL-6, iNOS, COX-2, MMP-9) zeigte sich eine Reduktion der mRNA-Expression. Die zuvor genannten Faktoren haben eine zentrale Stellung in der Pathogenese des PD und weiterer neurodegenerativer Erkrankungen (siehe 1.2.2). In den 24 h-Versuch konnte eine ausgeprägtere Reduktion als im 6 h-Versuch festgestellt werden. Dies könnte mit einem verzögerten Wirkungseintritt der HS erklärt werden. Die mRNA-Expression proinflammatorischer Faktoren wird über Signalkaskaden und eine Vielzahl von Zwischenschritten gesteuert, hier kann je nach Angriffspunkt der HS ihr Wirkungseintritt verzögert sein. Dieses Phänomen ist unter anderem bei der Therapie mit Glukokortikoiden bekannt. Hier liegt der Transkriptionsbeginn von

antiinflammatorischen Zytokinen häufig 4-24 h nach dem Beginn der Glukokortikoidtherapie [121].

Beachtung finden muss auch, dass HS als *sterile danger signal* gilt und neben LPS (erstes Signal) als zweites Signal für die Aktivierung des Inflammasoms sorgt [122]. Das Inflammasom ist ein Proteinkomplex, das durch die Aktivierung von IL-1 β aus proIL-1 β eine Entzündungsreaktion auslöst. Physiologischer Weise dient dieser Bestandteil des angeborenen Immunsystems der physiologischen Abwehr von Infektionen. Mit einer pathologischen Aktivierung des Inflammasoms verbundene Krankheiten sind unter anderem Cryopyrinopathien, Diabetes mellitus Typ 2, Kontaktallergien, Silikose und Asbestose [123]. Ist die Bildung von MSU-Kristallen bei einer Hyperurikämie ursächlich, kommt es zu einem Gichtanfall [124]. Erhöhte HS-Konzentrationen können zu MSU-Kristallen und in der Konsequenz zur Aktivierung des Inflammasoms führen. Es liegen derzeit keine Hinweise vor, dass HS in seiner gelösten Form das Inflammasom aktivieren kann [125]. Die in dieser Arbeit vorgeschlagene Dosierung von HS liegt unterhalb der Löslichkeitsgrenze von HS und sollte eine MSU-Bildung mit nachfolgender Inflammasom-Aktivierung vermeiden.

5.5 Wirkungsmechanismus der Harnsäure auf Mikroglia

HS ist ein polares Molekül und kann nicht ungehindert Zellmembranen überwinden. Es benötigt membranständige Rezeptoren oder Kanäle, um eine Wirkung auf die Zielzelle zu entfalten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HS die Aktivierung intrazellulärer proinflammatorischer Signalwege reduzieren kann. So zeigte sich eine verminderte Phosphorylierung von ERK1/2 und bedingt somit eine reduzierte nukleäre Translokation von NF κ B. Das Vorhandensein von HS-respondierenden Mechanismen in Zellen des Immunsystems könnte zur Selbstlimitierung von Entzündungsreaktionen dienen. HS wird in großen Mengen bei einer Zellnekrose freigesetzt [126]. Ist der zelluläre Schaden der lokalen Immunreaktion zu groß, könnte durch einen Anstieg der HS die Entzündungsreaktion reduziert werden. Umgekehrt signalisiert HS als endogenes Gefahrensignal das Vorliegen einer Infektion und triggert die Aktivität des Immunsystems [126]. Hier könnte HS als Adjuvans wirken und die Entscheidung, ob eine Entzündungsreaktion getriggert oder gezügelt wird einen wichtigen Einfluss ausüben.

Denkbar wären an der Zellmembran gelegene Rezeptoren, die HS binden und intrazellulär über eine Signalkaskade die Phosphorylierung von ERK1/2 verhindern. Möglich wäre auch ein Transport der HS über die Zellmembran in die Immunzelle mit einem intrazellulär gelegenen HS-Rezeptor, der den zuvor genannten Effekt bewirkt. Der genaue Wirkmechanismus der HS bleibt weiterhin ungeklärt, jedoch konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass HS einen direkten Einfluss auf die mRNA-Expression von proentzündlichen Faktoren ausübt. Diese Erkenntnis kann die Grundlage für weitere zelluläre und genetische Studien darstellen.

5.6 Klinische Relevanz von Harnsäure: Potenzial in der Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen?

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit stützen das Potenzial von HS in der Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen wie PD. Vor der Übertragung dieser Ergebnisse auf den Menschen müssen folgende Argumente Beachtung finden. Die untersuchte HS-Konzentration ist nicht ohne weiteres beim Menschen anwendbar. Alle Säugetiere mit Ausnahme der Menschenaffen sind mit dem Enzym der Uricase in der Lage, Harnsäure in Allantoin zu verstoffwechseln. Dieses spiegelt sich in der HS-Plasmakonzentrationen wieder. Beim Menschen beträgt diese 1,5 – 6,0 mg/dl; im Vergleich hierzu liegt sie bei Ratten und Mäusen nur bei 0,5 – 0,8 mg/dl [127]. So entspräche der Einsatz von 10 μ M HS im Rattenmodell beim Menschen ungefähr 75 μ M HS. Des Weiteren wurden selektierte Zellen mit gereinigtem LPS stimuliert und unter kontrollierten Rahmenbedingungen untersucht. Dieses stark vereinfachte Modell schließt nicht die komplexen Zusammenhänge einer sich im ZNS abspielenden Entzündungsreaktion mit ein. Jedoch konnte in dieser Arbeit erstmalig ein direkter Einfluss von Harnsäure auf die Expressionsraten von proinflammatorischen mRNA und Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren gezeigt werden. So zeigte sich durch die HS-Zugabe durchweg eine Reduzierung der Immunantwort in LPS-stimulierten Mikroglia. Über welche Rezeptoren oder Faktoren HS seine Wirkung in den Mikroglia entfaltet, ist noch nicht geklärt und bietet einen interessanten Ansatz zukünftiger Forschungen.

Die HS-Plasmakonzentration ist zuverlässig und sicher durch die orale Einnahme von Inosin steigerbar [106]. Die Ergebnisse dieser Grundlagenforschung könnten im Rahmen einer randomisierten klinischen Studie von PD-Patienten verifiziert werden.

So wäre eine ergänzend zur PD-Basistherapie regelmäßige Einnahme von Inosin möglich. Im Rahmen der Studie könnte ein Erfolg der Therapie über eine regelmäßige Quantifizierung der in dieser Studie betrachteten Entzündungsmediatoren im Serum und Liquor sowie den Einfluss auf die progressionsfreie Zeit der Erkrankung gemessen werden.

6 Zusammenfassung

Die steigende Prävalenz von neurodegenerativen Erkrankungen mit der hieraus resultierenden Mehrbelastung für das Gesundheitssystem macht die Erforschung neuer Therapieoptionen notwendig. Bei neurodegenerativen Erkrankungen trägt eine chronische Neuroinflammation durch anhaltende Aktivierung der ortsständigen Zellen des Immunsystems im ZNS zur Progredienz neurodegenerativer Erkrankungen wie die PD bei. Als Effektorzellen der Immunantwort fungieren Mikroglia. Eine mögliche Therapieoption ist die Erforschung von Substanzen, die eine Reduktion der immunologischen Prozesse im ZNS bewirken und somit die Progredienz der Neurodegeneration verlangsamen oder bestenfalls verhindern.

Harnsäure ist ein Metabolit des Purinstoffwechsels und stellt den Hauptteil der antioxidativen Kapazität im Blutplasma dar.

Die Wirkungsweise von Harnsäure im menschlichen Organismus ist bisher unzureichend erforscht, so wurden bisher meist die Folgen einer Hyperurikämie mit der Bildung von MSU-Kristallen und ihrer konsekutiven Folgen untersucht. In dieser Arbeit wurde der Effekt von Harnsäure auf ein *in vitro*-Modell von Neuroinflammation untersucht. Hierfür wurden Mikroglia neugeborener Ratten mit LPS aktiviert und mit HS koinkubiert. Hier zeigte sich eine signifikant verminderte Transkription von iNOS, IL-6, IL-1 β und TNF- α in Mikroglia sowie eine verminderte NO-Freisetzung.

In der letzten Dekade wurde vermehrt über die Rolle von Harnsäure im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen geforscht. Beim therapeutischen Einsatz von Harnsäure muss die Entstehung einer Hyperurikämie verhindert werden. Die sich in diesem Falle bildenden MSU-Kristallen sind Auslöser der Gicht und stehen im Zusammenhang mit kardiovaskulären Ereignissen und der Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2. Die in dieser Arbeit untersuchten Harnsäurekonzentrationen wurden so gewählt, dass eine hohe therapeutische Wirkung erzielt wurde, aber die Löslichkeitsgrenze von HS nicht überschritten wurde. Therapeutisch kann eine Erhöhung der Plasmakonzentration der Harnsäure durch orale Gabe von Inosin erreicht werden. Dieses Verfahren stellte sich als effektiv und nebenwirkungsarm dar. Weiterhin konnte eine signifikante Beeinflussung der intrazellulären MAP-Kinase-Signalkaskade durch Harnsäure nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen das antiinflammatorische und mögliche neuroprotektive Potential von Harnsäure. Weiterführende *in vivo*-Experimente sollten zur Evaluierung

der Therapieoption der Harnsäure in randomisierten Kontrollstudien durchgeführt werden.

7 Literatur

- 1 Statistisches Bundesamt. Statistisches Jahrbuch Deutschland 2015. 1. Aufl. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt; 2015
- 2 de Lau LML, Breteler MMB. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006; 5: 525–535
- 3 Bach JP, Riedel O, Klotsche J, Spottke A, Dodel R, Wittchen HU. Impact of complications and comorbidities on treatment costs and health-related quality of life of patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2012; 314: 41–47
- 4 von Campenhausen S, Winter Y, e Silva AR, Sampaio C, Ruzicka E, Barone P, Poewe W, Guekht A, Mateus C, Pfeiffer KP, Berger K, Skoupa J, Bötzel K, Geiger-Gritsch S, Siebert U, Balzer-Geldsetzer M, Oertel WH, Dodel R, Reese JP. Costs of illness and care in Parkinson's Disease: An evaluation in six countries. *Eur Neuropsychopharmacol* 2011; 21: 180–191
- 5 Schrag A BP. Time of Loss of Employment in Parkinson's Disease. *Mov Disord* 2006; 21: 1839–1843
- 6 Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshall FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A, Tanner CM. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 2007; 2007: 384–386
- 7 Fearnley JM LAJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. 2283-301. *Brain* 1991; 114: 2283–2301
- 8 Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 197–211
- 9 Mezey E, Dehejia AM, Harta G, Suchy SF, Nussbaum RL, Brownstein MJ, Polymeropoulos MH. Alpha synuclein is present in Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease. *Mol Psychiatry* 1998; 3: 493–499
- 10 Dunnett SB BA. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* 1999; 399: 39
- 11 Hornykiewicz O. Basic research on dopamine in Parkinson's disease and the discovery of the nigrostriatal dopamine pathway: the view of an eyewitness. *Neurodegener Dis* 2008; 5: 114–117
- 12 Kalia LV LAE. Parkinson's disease. *Lancet* 2015; 386: 896–912
- 13 Gibb WR LAJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988; 51: 745–752
- 14 Ross GW, Petrovitch H, Abbott RD, Tanner CM, Popper J, Masaki K, Launer L, White LR. Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2008; 63: 167–173
- 15 Hely MA, Morris JG, Reid WG, Trafficante R. Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years. *Mov Disord* 2005; 20: 190–199
- 16 Buhmann C, Maintz L, Hierling J, Vettorazzi E, Moll CK, Engel AK, Gerloff C, Hamel W, Zangemeister WH. Effect of subthalamic nucleus deep brain stimulation on driving in Parkinson disease. *Neurology* 2014; 82: 32–40
- 17 von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, Bötzel K, Sampaio C, Poewe W, Oertel W, Siebert U, Berger K, Dodel R. Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol* 2005; 15: 473–490

- 18 Guttman M, Slaughter PM, Theriault ME, DeBoer DP, Naylor CD. Burden of parkinsonism: A population-based study. *Mov Disord* 2003; 18: 313–319
- 19 de Lau LM, Schipper CM, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. Prognosis of Parkinson disease: risk of dementia and mortality: the Rotterdam Study. *Arch Neurol* 2005; 62: 1265–1269
- 20 Westerlund M, Hoffer B, Olson L. Parkinson's disease: Exit toxins, enter genetics. *Prog Neurobiol* 2010; 90: 146–156
- 21 Hardy J, Lewis P, Revesz T, Lees A, Paisan-Ruiz C. The genetics of Parkinson's syndromes: a critical review. *Curr Opin Genet Dev* 2009; 19: 254–265
- 22 Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 2004; 318: 121–134
- 23 Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 2004; 318: 121–134
- 24 Galvin JE. Interaction of alpha-synuclein and dopamine metabolites in the pathogenesis of Parkinson's disease: a case for the selective vulnerability of the substantia nigra. *Acta Neuropathol* 2006; 112: 115–126
- 25 George JM. The synucleins. *Genome Biol* 2002; 3
- 26 Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A. Mice Lacking α -Synuclein Display Functional Deficits in the Nigrostriatal Dopamine System. *Neuron* 2000; 25: 239–252
- 27 Kumar R, Jangir DK, Verma G, Shekhar S, Hanpude P, Kumar S, Kumari R, Singh N, Sarovar Bhavesh N, Ranjan Jana N, Kanti Maiti T. S-nitrosylation of UCHL1 induces its structural instability and promotes alpha-synuclein aggregation. *Sci Rep* 2017; 7: 44558
- 28 Hirsch EC, Hunot S, Damier P, Faucheux B. Glial cells and inflammation in parkinson's disease: A role in neurodegeneration? *Ann Neurol* 1998; 44: 115–120
- 29 Teismann P, Tieu K, Cohen O, Choi DK, Wu DC, Marks D, Vila M, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2003; 18: 121–129
- 30 Roodveldt C, Christodoulou J, Dobson CM. Immunological features of α -synuclein in Parkinson's disease. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 1820–1829
- 31 McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 1988; 38: 1285–1291
- 32 Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983; 219: 979–980
- 33 Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res* 1979; 1: 249–254
- 34 Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 4546–4550
- 35 Brochard V, Combadière B, Prigent A, Laouar Y, Perrin A, Beray-Berthat V, Bonduelle O, Alvarez-Fischer D, Callebert J, Launay JM, Duyckaerts C, Flavell RA, Hirsch EC, Hunot S. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain

- contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest* 2008; 119: 182–192
- 36 Hunot S, Boissière F, Faucheux B, Brugg B, Mouatt-Prigent A, Agid Y, Hirsch EC. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience* 355-363; 72
- 37 Knott C, Stern G, Wilkin GP. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci* 2000; 16: 724–739
- 38 Long-Smith CM, Sullivan AM, Nolan YM. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2009; 89: 277–287
- 39 MEDAWAR PB. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* 1948; 29: 58–69
- 40 Cohen IR SM. Autoimmune maintenance and neuroprotection of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 1999; 100: 111–114
- 41 Nitsch R, Bechmann I, Deisz RA, Haas D, Lehmann TN, Wendling U, Zipp F. Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet* 2000; 356: 827–828
- 42 Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 1995; 377: 630–632
- 43 Wenkel H, Streilein JW, Young MJ. Systemic immune deviation in the brain that does not depend on the integrity of the blood-brain barrier. *J Immunol* 2000; 164: 5125–5131
- 44 Streit WJ. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 2002; 40: 133–139
- 45 Wilms H, Sievers J, Rickert U, Rostami-Yazdi M, Mrowietz U, Lucius R. Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation. *J Neuroinflammation* 2010; 7: 1–8
- 46 Crutcher KA, Gendelman HE, Kipnis J, Perez-Polo JR, Perry VH, Popovich PG, Weaver LC. Debate: "is increasing neuroinflammation beneficial for neural repair?". *J Neuroimmune Pharmacol* 2006; 1: 195–211
- 47 Can the immune system be harnessed to repair the CNS? Can the immune system be harnessed to repair the CNS? *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 481–493
- 48 Benveniste EN, Nguyen VT, O'Keefe GM. Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2001; 39: 381–391
- 49 Benveniste EN. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med (Berl)* 1997; 75: 165–173
- 50 Monif M, Burnstock G, Williams DA. Microglia: proliferation and activation driven by the P2X7 receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42: 1753–1756
- 51 Suzumura A, Sawada M, Yamamoto H, Marunouchi T. Transforming growth factor-beta suppresses activation and proliferation of microglia in vitro. *J Immunol* 1993; 151: 2150–2158
- 52 Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol* 2007; 208: 1–25
- 53 Wyss-Coray T ML. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* 2002; 35: 419–432

- 54 Marchetti B AMP. To be or not to be (inflamed)--is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 517–525
- 55 Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 2005; 8: 752–758
- 56 Garnett MJ MR. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004; 6: 313–319
- 57 Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 2012; 66: 105–143
- 58 Wilms H, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Zecca L, Lucius R. Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. *FASEB J* 2003; 17: 500–502
- 59 Bassani TB, Vital MA, Rauh LK. Neuroinflammation in the pathophysiology of Parkinson's disease and therapeutic evidence of anti-inflammatory drugs. *Arg Neuropsiquiat* 2015; 73: 616–623
- 60 Kim SY, Woo MS, Park JS, Kim HS. Regulation of matrix metalloproteinase-9 gene expression in MPP+/- or 6-OHDA-treated human neuroblastoma SK-N-BE(2)C cells. *Neurochem Int* 2010; 56: 437–442
- 61 Çomoğlu SS, Güven H, Acar M, Öztürk G, Koçer B. Tear levels of tumor necrosis factor-alpha in patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2013; 553: 63–67
- 62 Dobbs RJ, Charlett A, Purkiss AG, Dobbs SM, Weller C, Peterson DW. Association of circulating TNF-alpha and IL-6 with ageing and parkinsonism. *Acta Neurol Scand* 1999; 100: 34–41
- 63 Dursun E, Gezen-Ak D, Hanağası H, Bilgiç B, Lohmann E, Ertan S, Atasoy İL, Alaylıoğlu M, Araz ÖS, Önal B, Gündüz A, Apaydın H, Kızıltan G, Ulutin T, Gürvit H, Yılmaz S. The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease. *J Neuroimmunol* 2015; 283: 50–57
- 64 Hunot S, Boissière F, Faucheux B, Brugg B, Mouatt-Prigent A, Agid Y, Hirsch EC. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience* 1996; 72: 355–363
- 65 Broom L, Marinova-Mutafchieva L, Sadeghian M, Davis JB, Medhurst AD, Dexter DT. Neuroprotection by the selective iNOS inhibitor GW274150 in a model of Parkinson disease. *Free Radic Biol Med* 2011; 50: 633–640
- 66 Lorenzl S, Calingasan N, Yang L, Albers DS, Shugama S, Gregorio J, Krell HW, Chirichigno J, Joh T, Beal MF. Matrix metalloproteinase-9 is elevated in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in mice. *Neuromolecular Med* 2004; 5: 119–132
- 67 Hehlhans T PK. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005; 115: 1–20
- 68 Bobby R, Robustelli P, Kralicek AV, Mobli M, King GF, Grötzinger J, Dingley AJ. Functional implications of large backbone amplitude motions of the glycoprotein 130-binding epitope of interleukin-6. *FEBS J* 2014; 281: 2471–2483
- 69 Dinarello CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med* 2005; 201: 1355–1359

- 70 de Meira Santos Lima M, Braga Reksidler A, Marques Zanata S, Bueno Machado H, Tufik S, Vital MA. Different parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. *Brain Res* 2006; 1101: 117–125
- 71 Reksidler AB, Lima MM, Zanata SM, Machado HB, da Cunha C, Andreatini R, Tufik S, Vital MA. The COX-2 inhibitor parecoxib produces neuroprotective effects in MPTP-lesioned rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 560: 163–175
- 72 Bove PF, Wesley UV, Greul AK, Hristova M, Dostmann WR, van der Vliet A. Nitric oxide promotes airway epithelial wound repair through enhanced activation of MMP-9. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36: 138–146
- 73 Lee EJ, Woo MS, Moon PG, Baek MC, Choi IY, Kim WK, Junn E, Kim HS. Alpha-synuclein activates microglia by inducing the expressions of matrix metalloproteinases and the subsequent activation of protease-activated receptor-1. *J Immunol* 2010; 185: 615–623
- 74 He X, Zhang L, Yao X, Hu J, Jia H, An R, Liu Z, Xu Y. Association Studies of MMP-9 in Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE* 2013; 8: e73777
- 75 Lorenzl S, Albers DS, Narr S, Chirichigno J, Beal MF. Expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-1 and Their Endogenous Counterregulators TIMP-1 and TIMP-2 in Postmortem Brain Tissue of Parkinson's Disease. *Exp Neurol* 2002; 178: 13–20
- 76 Maiuolo J, Oppedisano F, Gratteri S, Muscoli C, Mollace V. Regulation of uric acid metabolism and excretion. *Int J Cardiol* 2016; 213: 8–14
- 77 de Lau LM, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM. Serum uric acid levels and the risk of Parkinson disease. *Ann Neurol* 2005; 58: 797–800
- 78 Weisskopf MG, O'Reilly E, Chen H, Schwarzschild MA, Ascherio A. Plasma urate and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 2007; 166: 561–567
- 79 Ascherio A, LeWitt PA, Xu K, Eberly S, Watts A, Matson WR, Marras C, Kieburtz K, Rudolph A, Bogdanov MB, Schwid SR, Tennis M, Tanner CM, Beal MF, Lang AE, Oakes D, Fahn S, Shoulson I, Schwarzschild MA, Parkinson Study Group DATATOP Investigators. Urate as a predictor of the rate of clinical decline in Parkinson disease. *Arch Neurol* 2009; 66: 1460–1468
- 80 McFarland NR, Burdett T, Desjardins CA, Frosch MP, Schwarzschild MA. Postmortem brain levels of urate and precursors in Parkinson's disease and related disorders. *Neurodegener Dis* 2013; 12: 189–198
- 81 Zhang H, Guo JF, He D, Lei LF, Wang YQ, Wang CY, Tan LM, Yan XX, Shen L, Tang BS. Lower serum UA levels in Parkinson's disease patients in the Chinese population. *Neurosci Lett* 2012; 514: 152–155
- 82 Sun CC, Luo FF, Wei L, Lei M, Li GF, Liu ZL, Le WD, Xu PY. Association of serum uric acid levels with the progression of Parkinson's disease in Chinese patients. *Chin Med J (Engl)* 2012; 125: 583–587
- 83 Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI, Aldini G. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Arch Biochem Biophys* 2004; 430: 97–103
- 84 Sautin YY JRJ. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox 2008; 27: 608–619
- 85 Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 53 Suppl 3: 26–36
- 86 Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87: 315–424

- 87 Sampat R, Young S, Rosen A, Bernhard D, Millington D, Factor S, Jinnah HA. Potential mechanisms for low uric acid in Parkinson disease. *J Neural Transm (Vienna)* 2016; 123: 365–370
- 88 Lin WT, Chan TF, Huang HL, Lee CY, Tsai S, Wu PW, Yang YC, Wang TN, Lee CH. Fructose-Rich Beverage Intake and Central Adiposity, Uric Acid, and Pediatric Insulin Resistance. *J Pediatr* 2016; 171: 90–96
- 89 Zgaga L, Theodoratou E, Kyle J, Farrington SM, Agakov F, Tenesa A, Walker M, McNeill G, Wright AF, Rudan I, Dunlop MG, Campbell H. The association of dietary intake of purine-rich vegetables, sugar-sweetened beverages and dairy with plasma urate, in a cross-sectional study. *PLoS ONE* 2012; 7: e38123
- 90 Johnson RJ, Kang DH, Feig D, Kivlighn S, Kanellis J, Watanabe S, Tuttle KR, Rodriguez-Iturbe B, Herrera-Acosta J, Mazzali M. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *Hypertension* 2003; 41: 1183–1190
- 91 Caulfield MJ, Munroe PB, O'Neill D, Witkowska K, Charchar FJ, Doblado M, Evans S, Eyheramendy S, Onipinla A, Howard P, Shaw-Hawkins S, Dobson RJ, Wallace C, Newhouse SJ, Brown M, Connell JM, Dominiczak A, Farrall M, Lathrop GM, Samani NJ, Kumari M, Marmot M, Brunner E, Chambers J, Elliott P, Kooner J, Laan M, Org E, Veldre G, Viigimaa M, Cappuccio FP, Ji C, Iacone R, Strazzullo P, Moley KH, Cheeseman C. SLC2A9 is a high-capacity urate transporter in humans. *PLoS Med* 2008; 5: e197
- 92 Anzai N, Kanai Y, Endou H. New insights into renal transport of urate. *Curr Opin Rheumatol* 2007; 19: 151–157
- 93 Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 6858–6862
- 94 Kellogg EW 3rd, Fridovich I. Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1977; 252: 6721–6728
- 95 Gersch C, Palli SP, Kim KM, Angerhofer A, Johnson RJ, Henderson GN. Inactivation of nitric oxide by uric acid. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2008; 27: 967–978
- 96 Niklasson F AH. Brain energy metabolism and blood-brain barrier permeability in depressive patients: analyses of creatine, creatinine, urate, and albumin in CSF and blood. *Biol Psychiatry* 1984; 19: 1183–1206
- 97 Tomioka NH, Nakamura M, Doshi M, Deguchi Y, Ichida K, Morisaki T, Hosoyamada M. Ependymal cells of the mouse brain express urate transporter 1 (URAT1). *Fluids Barriers CNS* 2013; 10: 31
- 98 Wu XW, Muzny DM, Lee CC, Caskey CT. Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. *J Mol Evol* 1992; 34: 78–84
- 99 Oda M, Satta Y, Takenaka O, Takahata N. Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications. *Mol Biol Evol* 2002; 19: 640–653
- 100 Fang P, Li X, Luo JJ, Wang H, Yang XF. A Double-edged Sword: Uric Acid and Neurological Disorders. *Brain Disord Ther* 2013; 2: 109
- 101 Rider TG JKM. The modern management of gout. *Rheumatology (Oxford)* 2010; 49: 5–14
- 102 Wu X, Liu J, Zhang J, Liu H, Yan M, Liang B, Xie H, Zhang S, Sun B, Zhou H. Folic acid reverses uric acid crystal-induced surface OAT1 internalization by inhibiting RhoA activity in uric acid nephropathy. *Mol Med Rep* 2016; 13: 2385–2392

- 103 Gagliardi AC, Miname MH, Santos RD. Uric acid: A marker of increased cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2009; 202: 11–17
- 104 Edwards NL. The role of hyperuricemia in vascular disorders. *Curr Opin Rheumatol* 2009; 21: 132–137
- 105 Hooper DC, Spitsin S, Kean RB, Champion JM, Dickson GM, Chaudhry I, Koprowski H. Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 675–680
- 106 Parkinson Study Group SURE-PD Investigators, Schwarzschild MA, Ascherio A, Beal MF, Cudkowicz ME, Curhan GC, Hare JM, Hooper DC, Kieburtz KD, Macklin EA, Oakes D, Rudolph A, Shoulson I, Tennis MK, Espay AJ, Gartner M, Hung A, Bwala G, Lenehan R, Encarnacion E, Ainslie M, Castillo R, Togasaki D, Barles G, Friedman JH, Niles L, Carter JH, Murray M, Goetz CG, Jaglin J, Ahmed A, Russell DS, Cotto C, Goudreau JL, Russell D, Parashos SA, Ede P, Saint-Hilaire MH, Thomas CA, James R, Stacy MA, Johnson J, Gauger L, Antonelle de Marcaida J, Thurlow S, Isaacson SH, Carvajal L, Rao J, Cook M, Hope-Porche C, McClurg L, Grasso DL, Logan R, Orme C, Ross T, Brocht AF, Constantinescu R, Sharma S, Venuto C, Weber J, Eaton K. Inosine to increase serum and cerebrospinal fluid urate in Parkinson disease: a randomized clinical trial. *JAMA Neurol* 2014; 71: 141–150
- 107 Yamamoto T, Moriwaki Y, Cheng J, Takahashi S, Tsutsumi Z, Ka T, Hada T. Effect of inosine on the plasma concentration of uridine and purine bases. *Metabolism* 2002; 51: 438–442
- 108 Schwarzschild MA, Schwid SR, Marek K, Watts A, Lang AE, Oakes D, Shoulson I, Ascherio A, Parkinson Study Group PRECEPT Investigators, Hyson C, Gorbold E, Rudolph A, Kieburtz K, Fahn S, Gauger L, Goetz C, Seibyl J, Forrest M, Ondrasik J. Serum urate as a predictor of clinical and radiographic progression in Parkinson disease. *Arch Neurol* 2008; 65: 716–723
- 109 Berridge MV TAS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 1993; 303: 474–482
- 110 Wakelin LP, Adams A, Hunter C, Waring MJ. Interaction of crystal violet with nucleic acids. *Biochemistry* 1981; 20: 5779–5787
- 111 Gillies RJ, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem* 1986; 159: 109–113
- 112 Nakamura Y. Regulating factors for microglial activation. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 945–953
- 113 Grisham MB, Johnson GG, Lancaster JR Jr. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol* 1996; 268: 237–246
- 114 Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995; 4: 357–362
- 115 Hwang HS, Yang CM, Park SJ, Kim HA. Monosodium Urate Crystal-Induced Chondrocyte Death via Autophagic Process. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 29265–29277
- 116 Si QS, Nakamura Y, Schubert P, Rudolphi K, Kataoka K. Adenosine and propentofylline inhibit the proliferation of cultured microglial cells. *Exp Neurol* 1996; 137: 345–349

- 117 Eleftheriadis T, Pissas G, Karioti A, Antoniadis G, Golfinopoulos S, Liakopoulos V, Mamara A, Speletas M, Koukoulis G, Stefanidis I. Uric acid induces caspase-1 activation, IL-1 β secretion and P2X7 receptor dependent proliferation in primary human lymphocytes. *Hippokratia* 2013; 17: 141–145
- 118 Gicquel T, Robert S, Loyer P, Victorini T, Bodin A, Ribault C, Gleonnec F, Couillin I, Boichot E, Lagente V. IL-1 β production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages. *FASEB J* 2015; 29: 4162–4173
- 119 Arimoto T BG. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 2003; 12: 35–45
- 120 Park JH, Jin YM, Hwang S, Cho DH, Kang DH, Jo I. Uric acid attenuates nitric oxide production by decreasing the interaction between endothelial nitric oxide synthase and calmodulin in human umbilical vein endothelial cells: a mechanism for uric acid-induced cardiovascular disease development. *Nitric Oxide* 2013; 32: 36–42
- 121 Alangari AA. Genomic and non-genomic actions of glucocorticoids in asthma. *Ann Thorac Med* 2010; 5: 133–139
- 122 Schroder K TJ. The inflammasomes. *Cell* 2010; 140: 821–832
- 123 Hoffman HM WAA. Inflammasome and IL-1 β -mediated disorders. *Curr Allergy Asthma Rep* 2010; 10: 229–235
- 124 Talbott JH. SERUM URATE IN RELATIVES OF GOUTY PATIENTS. *J Clin Invest* 1940; 19: 645–648
- 125 Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006; 440: 237–241
- 126 Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003; 425: 516–521
- 127 So A TB. Uric acid transport and disease. *J Clin Invest* 2010; 120: 1791–1799
- 128 Chomczynski P, Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction, *Anal Biochem*. 1987, 162: 156-159

8 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst und selbständig angefertigt habe, dass ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe und dass ich die Arbeit gemäß den Regeln zur guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt habe. Weiter erkläre ich, dass ich nicht mit demselben Thema zeitgleich an einer anderen Hochschule oder Fakultät die Zulassung zur Promotion beantragt habe oder werde, ich an keiner anderen Hochschule oder an keiner anderen Fakultät dieser Hochschule ein Promotionsverfahren endgültig nicht bestanden habe und dass mir noch kein akademischer Grad entzogen wurde.

Lars Scheffel Kiel, den 06.11.2019

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ralph Lucius für die Überlassung dieses spannenden Themas, die Bereitstellung des Promotionsplatzes, die Anregungen und kritischen Auseinandersetzungen mit der experimentellen Forschung und den Versuchsergebnissen sowie der schönen Zeit als Tutor bei den Histologie- und Biologiekursen.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Uta Rickert für die schöne Zusammenarbeit, die Unterstützung bei den Experimenten, Auswertung und Verfassen dieser Dissertation sowie die stetige freundschaftliche Motivation.

Meinen großen Dank gilt Frau Monika Grell, Frau Gaby Steinkamp, Herrn Günther Schäfer, Frau Marion Kölln und Frau Katrin Neblung-Masuhr, die mich in das praktische Arbeiten im Labor und die Durchführung der Versuche einwiesen und jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, meinen Schwestern und Freunden bedanken, die mich auf den Weg begleiteten und stets unterstützten. Einen großen Dank an all diejenigen, die sich die Zeit genommen haben, meine Arbeit Korrektur zu lesen und mit kritischen Anregungen zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen haben.